

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. D. Reinhardt

# **Molekulare und funktionelle Charakterisierung von Targetingsequenzen im humanen ABCA3-Protein**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Daniel Wolfgang Schulte  
aus Bonn  
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. A. Holzinger
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Jürgen Behr Prof. Dr. Rudolf M. Huber
Mitbetreuung durch den Promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. A. Holzinger
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser
Tag der mündlichen Prüfung:	23.10.2008

*Meinen Geschwistern gewidmet*

*„Natura non facit saltus.“*

Aristoteles



## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	1
<b>1. Einleitung</b>	<b>2</b>
1.1 Das Atemnotsyndrom	2
1.2 Die Superfamilie der ABC-Proteine	3
1.2.1 Molekulare Grundlagen	3
1.2.2 Aufgabe und Funktion	5
1.2.3 Einteilung	5
1.3 Beispiele für Erkrankungen bei Mutationen in ABC-Genen	5
1.4 Die Untergruppe der ABCA-Proteine	6
1.5 Das ABCA3-Protein	7
1.5.1 ABCA3 und Surfactant	8
1.5.2 Surfactantmangel und seine genetisch bedingten Ursachen	9
1.5.3 Das histopathologische Bild bei Surfactantmangel	10
1.5.4 Klinisches Bild bei ABCA3-Mangel	12
1.6.1 Targetingsignale zu Endo- und Lysosomen	13
<b>2. Zielsetzung und Aufgabenstellung</b>	<b>14</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
3.1 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden	15
3.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	15
3.1.2 Herstellung von Oligonukleotiden	15
3.1.3 Aufreinigung der PCR-Produkte	17
3.1.4 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	17
3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	18
3.1.6 Dephosphorylierung der Vektor-DNA	19
3.1.7 Herstellung von blunt-end-Fragmenten	19
3.1.8 Auffüllen von DNA-Enden durch Behandlung mit dem Klenow-Enzym	20
3.1.9 Ligation	20
3.1.10. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	21
3.1.11 Molekulargewichtsstandards für DNA	21
3.1.12 Aufreinigung von Plasmid-DNA	21
3.1.13 Herstellung von Glycerinkryokulturen (Glycerinstocks)	22

3.1.14	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	22
3.1.15	Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	22
3.1.16	PCR zum Nachweis erfolgreich transformierter Klone	24
3.1.17	Restriktionsverdau zur Identifizierung transformierter Klone	24
3.1.18	Sequenzierung der Produkte	25
3.1.19	Präzipitation der DNA	25
3.2	Herstellung von rekombinanten Plasmiden	26
3.2.1	Expressionsvektor für ein Fusionsprotein hABCA3 und YFP	26
3.2.2	Fusionsprotein von verkürzten ABCA3-Produkten und YFP	27
3.2.3	Expressionsvektor für ein Fusionsprotein CFP und SPC	28
3.3	Zellkultur	28
3.3.1	Kultur eukaryotischer Zelllinien	28
3.3.2	Aussaat und Kultur von A549-Zellen	29
3.3.3	Transiente Zelltransfektion	29
3.3.4	Immunfluoreszenzfärbung	31
3.3.5	Fluoreszenzmikroskopie	32
3.4	Proteinbiochemische Methoden	33
3.4.1	Homogenisation von Zellen	33
3.4.2	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	33
3.4.3	Western Blot	34
4.	<b>Ergebnisse</b>	36
4.1	Vorgehen	36
4.2	Fluoreszierende Proteine	38
4.3	Insiliko-Methoden zur Berechnung der Sekundärstruktur von ABCA3	39
4.4	Kolokalisationsstudien zur Untersuchung des Targetingsignals des humanen ABCA3-Transporters	40
4.4.1	ABCA3 besitzt ein aminoterminal Targetingsignal	40
4.4.2	Natives YFP zeigt eine zytosolische Lokalisation	41
4.4.3	Kolokalisationsversuche zur Darstellung der zellulären Sublokalisierung	41
4.4.4	Kolokalisationsversuche zum Nachweis des Signalpeptids	42
4.4.4.1	Das Targetingsignal liegt innerhalb der ersten 115 AS	42
4.4.4.2	Das Targetingsignal liegt innerhalb der ersten 44 AS	44
4.4.4.3	Das Targetingsignal liegt zwischen den AS 22 und 44	45
4.5	Proteinbiochemische Analyse der Fusionskonstrukte	46
5.	<b>Diskussion</b>	48

6.	<b>Zusammenfassung</b>	51
7	<b>Anhang</b>	52
7.1	Literaturverzeichnis	52
7.2	Tabellenverzeichnis	55
7.3	Abbildungsverzeichniss	56
7.4	Danksagung	57
7.5	Lebenslauf	58

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ABC	ATP binding cassette
ALD	Adrenoleukodystrophie
AS	Aminosäure
AT II Zellen	Alveolarepithelzellen Typ II
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
CPAP	Continuous positive airway pressure
DIP	Desquamative interstitial pneumonitis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HDL	High density lipoprotein
ILD	Interstitial lung disease
kDa	Kilodalton
min	Minute(n)
MCS	Multiple Klonierungsstelle
NBD	Nukleotidbindene Domäne
NBF	Nucleotid binding fold
nm	Nanometer
LBM	Lamellar body membrane
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RDS	Respiratory distress syndrome
SP-A	Surfactantprotein A
SP-B	Surfactantprotein B
SP-C	Surfactantprotein C
SP-D	Surfactantprotein D
TM	Transmembrandomäne
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Atemnotsyndrom

Mutationen im Transportprotein ABCA3 gehören zu den zuletzt bekannt gewordenen genetischen Ursachen des Atemnotsyndroms reifer Neugeborener.

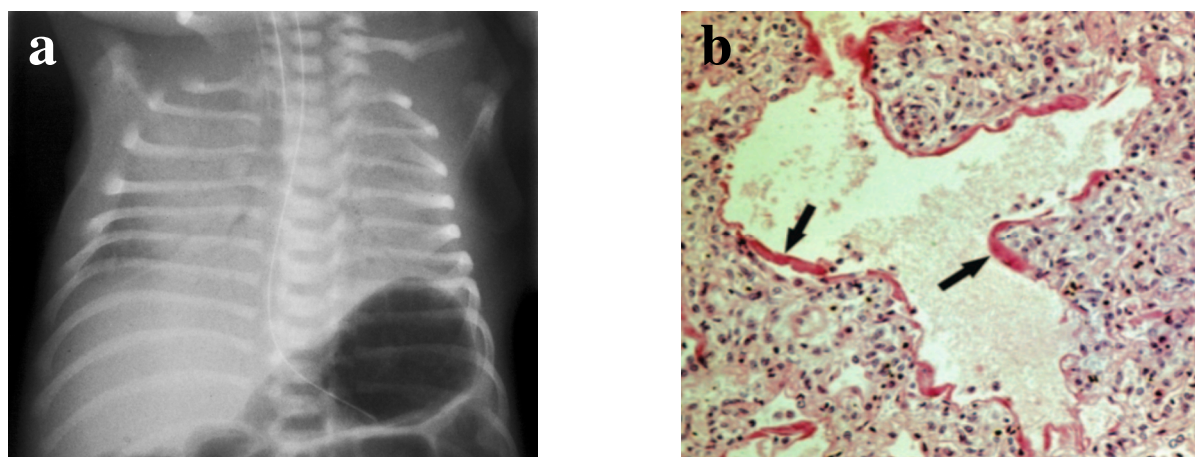
Dieses Syndrom welches synonym auch als Respiratory Distress Syndrom (RDS) oder hyalines Membransyndrom bezeichnet wird, ist die häufigste Todesursache der Neonatalperiode (Koletzko 2004). Pathophysiologische Ursache der Erkrankung ist ein primärer Surfactantmangel in einer strukturell unreifen Lunge.

Die Hauptaufgabe des Surfactant (surface active agent), welches auch als Antiatelektasefaktor bezeichnet wird, liegt in der Reduktion der Oberflächenspannung der Alveolen in der Lunge. Dieser Mechanismus spielt für die Adaptation des Neugeborenen nach der Geburt eine herausragende Rolle.

Die Surfactantdefizienz führt zu einer Atelektase von Teilen des Lungengewebes, welche nur noch durch hohe Beatmungsdrücke belüftet werden können. Aus diesen Massnahmen resultieren Schäden im Bereich der terminalen Atemwege und primitiven Alveolen. Die Erkrankung wird durch die intraalveoläre Akkumulation von Plasmaproteinen kompliziert und führt zum charakteristischen histologischen Bild von hyalinen Membranen im Bereich der Alveolen. Begleitende pulmonale Hypertension, sekundäre inflammatorische Prozesse und (Super-) Infektionen können den Krankheitsverlauf zudem weiter verschlechtern.

Daraus resultiert ein typisches klinisches Erscheinungsbild mit Tachy- oder Dyspnoe, expiratorischem Stöhnen, inspiratorischen Einziehungen im Bereich des Thorax, sowie einem erhöhtem Sauerstoffbedarf. Radiologisch findet sich beim schweren RDS eine homogene Verschattung beider Lungen. Die Einteilung der Schweregrade erfolgt radiologisch von I bis IV nach Couchard (Couchard M 1974).

Ein RDS findet sich am häufigsten beim frühgeborenen Säugling, wobei die Symptomatik nach Gabe von Surfactant meist vollständig reversibel ist. Die Fälle mit einer genetisch bedingten Ursache sind hingegen sehr viel seltener und zumeist mit einem schweren Atemnotsyndrom verbunden. Bei diesen meist irreversiblen Formen konnten als Ursachen Mutationen in den Genen für Surfactant Proteinen B und jüngst dem humanen ABCA3-Transporter nachgewiesen werden.



**Abbildung 1.1.:** a: Röntgenaufnahme Thorax AP bei einem reifen Neugeborenen mit ABCA3-Mangel: Verdichtung des Lungenparenchyms mit Auslöschung der Zwerchfell- und Herzkonturen als Zeichen eines schweren RDS. Positives Luftbronchogramm. b: Histologisches Bild bei Surfactant-Mangel eines Frühgeborenen: die Alveolen werden von hyalinen Material ausgefüllt (Pfeile). Vergrößerung x75. HE-Färbung. (aus Geoffrey „Lung Disease in Premature Neonates: Radiologic-Pathologic Correlation, RadioGraphics 2005)

Bei einem Versagen konventioneller Atemunterstützung, wie Sauerstoffapplikation und Beatmung mit kontinuierlich positiven Beatmungsdruck (CPAP), oder bei einer unmittelbar postnatal aufgetretenen respiratorischen Insuffizienz bei intubierten unreifen Frühgeborenen, ist eine intratracheale Surfactantapplikation indiziert. Allgemein gültige Kriterien zur Indikation der Surfactant-Gabe gibt es bislang aber nicht. Die Therapie kann zu unterschiedlichen Zeitpunkten begonnen werden: als frühe oder prophylaktische Therapie unmittelbar postnatal oder bis 60 Minuten nach der Geburt oder als Interventionsbehandlung bei klinischen und radiologischen Zeichen eines RDS.

Für die Therapie stehen verschiedene Präparate zur Verfügung. Bei klinisch kontrollierten Studien zum Vergleich der Wirksamkeit von natürlichen Surfactant-Präparationen, welcher aus Schweine- und Rinderlungen isoliert wird, und technisch hergestelltem proteinfreien Präparationen zeigte sich ein Vorteil auf Seiten der natürlichen Surfactantpräparate hinsichtlich der Überlebensrate und der initialen Verbesserung des Gasaustauschs (Milligan DW 2001).

Ein additiver Effekt konnte zudem mit der Gabe von antenatal applizierten Kortikosteroiden nachgewiesen werden (Kari MA 1994).

## 1.2 Die Superfamilie der ABC-Proteine

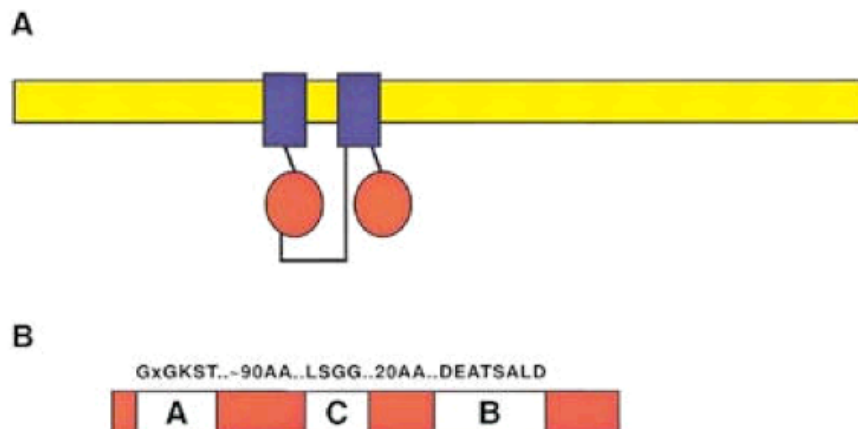
### 1.2.1 Molekulare Grundlagen

Der humane ABCA3-Transporter ist ein Mitglied der Superfamilie von ABC-Proteinen und gehört somit einer der größten Gruppe von Transmembranproteinen an (Dean M. 2005). Das menschliche Genom enthält 48 ABC-Transportergene. Die Abkürzung ABC leitet sich von dem Begriff „ATP Binding Cassette“ ab und beschreibt somit eine diesem Transportertyp zugrunde liegende strukturelle

Gemeinsamkeit: die Adenosintriphosphat (ATP)-bindende Domäne. An dieser Domäne des Proteins, welche auch als „nucleotid binding fold“ (NBF) bezeichnet wird, ermöglicht die Hydrolyse von ATP einen primär aktiven Transport von Substanzen über die Membran von unterschiedlichen Zellen hinweg.

Die etwa 100-150 Aminosäuren lange zytoplasmatische Proteinregion beinhaltet ein charakteristisches Sequenzmotiv, welches unter den unterschiedlichen ABC-Genen streng konserviert ist. Die als Walker A und B Region beschriebenen Motive sind etwa 6-8 Aminosäuren lang mit jeweils einer Unterbrechung von 90-120 Aminosäuren (Walker JE 1982, Hyde SC 1990). Etwa 25 Aminosäuren C-Terminal von Walker B liegt die Signatursequenz LSGGQ, die auch als C-Motiv bezeichnet wird.

Alle ABC-Proteine sind aus zwei unterschiedlichen Domänen aufgebaut: Zum einen aus der beschriebenen hydrophilen Region der ATP-Bindungskassette und andererseits aus einer vorwiegend hydrophoben Transmembrandomäne (TM).



**Abbildung 1.2:** A: Schematische Darstellung eines typischen ABC-Volltransporters in der Lipiddoppelschicht, welche gelb dargestellt ist. Die Transmembrandomäne ist blau und die ATP-Bindungsstelle rot abgebildet.

B: Die ATP-Bindungsstelle beinhaltet das Walker A und B Motiv. Die Signatursequenz C ist zusätzlich enthalten. Oben sind die häufigsten Aminosäuresequenzen in den Motiven angegeben. (aus „The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily“, Dean 2002)

Eine Transmembrandomäne besteht aus etwa 6-11 hydrophoben Segmenten, welche in Alphahelix-Struktur die Membran durchziehen. Sie ist im Vergleich zur ATP-Bindungskassette weit weniger konserviert und garantiert so den Transport der unterschiedlichen Substrate.

Es existieren verschiedene bioaktive Formen des ABC Transporters; Zum einen der Volltransporter, welcher aus jeweils zwei Transmembrandomänen und zwei ATP bindenden Domänen gebildet wird. Hierbei kann es zu Variationen in der Anordnung kommen (NBF-TM-NBF-TM oder TM-NBF-TM-NBF). Der Halbtransporter hingegen besteht aus einer Verbindung jeweils einer der beiden

unterschiedlichen Domänen (NBF-TM oder TM-NBF) und bildet zur vollen Funktionsfähigkeit entweder Homo- oder Heterodimere aus.

### **1.2.2 Aufgabe und Funktion**

Die eigentliche Aufgabe dieser Art von Proteinen besteht in der Beförderung (Translokation) einer Vielzahl von Substraten, unter anderem Lipiden, Sterolen, Aminosäuren, Kohlenhydraten, Elektrolyten und Medikamenten über die Zellmembran von Zellen unterschiedlicher Gewebe (Higgins 1992) hinweg. ABC-Proteine nehmen dabei auch Anteil an Signaltransduktion, Medikamenten-Resistenz, Antigenprozessierung und -präsentation. In eukaryotischen Zellen befinden sich derartige Transporter neben der Plasmamembran auch in den Membranen der Zellorganellen, beispielsweise dem Golgiapparat, dem Endoplasmatischen Retikulum oder den Peroxisomen. Seine Funktion liegt hierbei im unidirektionalen Transport von meist hydrophoben Substanzen vom Intra- in den Extrazellularraum beziehungsweise aus dem Zytoplasma in ein Zellkompartiment hinein.

Die genaue biologische Funktion ist aufgrund der komplexen Struktur der vergleichsweise großen Moleküle und ihrer „versteckten“ Lage innerhalb der Membran zwischen unterschiedlichen Zellkompartimenten schwer zu ermitteln. Zudem sind die Proteine in ein komplexes membrangebundenes Funktionssystem integriert. Daher ist auch die Funktion der meisten ABC-Proteine bis heute unklar. Die eindeutigsten Funktionsanalysen lassen sich aus „loss of function“-Mutationen ableiten. Entweder im Rahmen von monogen vererbten Erkrankungen, oder im Zusammenhang mit „knockout“-Modellen im Rahmen von Tierversuchen.

### **1.2.3 Einteilung**

Die ABC-Proteine als Ganzes können in 7 Untergruppen (A bis G) eingeteilt werden, wobei die Einteilung in Hinblick auf Ähnlichkeiten in der Genstruktur, der Anordnung der Proteindomänen, sowie in der Homologie der Aminosäure-Sequenz erfolgte.

## **1.3 Beispiele von Erkrankungen bei Mutationen in ABC-Genen**

Einer großen Zahl höchst unterschiedlicher Erkrankungen liegt eine Mutation in der kodierenden Basenfolge eines ABC-Transporters zugrunde. Darunter auch die häufigste erbliche Lungenerkrankung Cystische Fibrose, welche durch eine Mutation in *ABCC7* (=CFTR) bedingt ist.



Gen	Krankheit	OMIM*
<i>ABCA1</i>	Tangier-Krankheit	600046
<i>ABCA3</i>	Surfactant Mangel Syndrom	601615
<i>ABCA4</i>	Stargardt-Krankheit, Fundus flavimaculatus, Retinitis pigmentosa, Cone-Rod Dystrophie, Altersabhängige Makuladegeneration	248200
<i>ABCA12</i>	Harlequin Ichthyosis Lamelläre Ichthyosis	607800
<i>ABCB4</i>	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase, intrahepatische Cholestase der Schwangeren (ICP)	171060
<i>ABCB11</i>	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase	603201
<i>ABCC2</i>	Dubin-Johnson-Syndrom	601107
<i>ABCC6</i>	Pseudoxanthoma elasticum	603234
<i>ABCC7</i>	Zystische Fibrose	602421
<i>ABCC8</i>	Familiäre persistente insulinabhängige Hypoglykämie des Kindes (FPHI)	600509
<i>ABCD1</i>	Adrenoleukodystrophie	300100
<i>ABCG5</i>	Sitosterolämie	605459
<i>ABCG8</i>	Sitosterolämie	605460

**Tabelle 1.1** Übersicht über unterschiedliche Erkrankungen, welche auf Mutationen in *ABC*-Genen beruhen. Grau unterlegt die Gene der Gruppe *ABCA*.

#### 1.4 Die Untergruppe der *ABCA*-Proteine

Die Untergruppe der *ABCA*-Proteine umfasst 12 Mitglieder, welche sich aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten von den übrigen *ABC* Proteinen unterscheiden. In dieser Gruppe kommt nur der Typ Volltransporter vor, welcher jeweils aus zwei NBFs und zwei Transmembrandomänen besteht. Der Subfamilie *ABCA* gehören einige der größten *ABC*-Proteine an. Das Spektrum reicht von 1543 Aminosäuren bei *ABCA10* bis zu 5058 im Fall des *ABCA13*.

Die 12 bekannten humanen *ABCA*-Transporter wurden mit *ABCA1* bis *ABCA13* bezeichnet. Diese Nomenklatur ist jedoch in gewisser Weise verwirrend, da es kein funktionelles *ABCA11*-Gen gibt.

Vier der 12 *ABCA*-Gene konnten bisher in ihrer Funktion charakterisiert werden, wobei alle entscheidenden Funktionen im Lipidstoffwechsel besitzen. Im Folgenden soll nun ein kurzer Überblick über die Funktion und Pathophysiologie gegeben werden:

Das Protein *ABCA1* wirkt im peripheren Lipidtransport mit in dem es den zellulären Cholesterinexport reguliert. Mutationen in diesem Gen führen zu der so genannten Tangier Krankheit; bei dieser seltenen autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung kommt es zu der Akkumulation von Cholesterol in den Zellen des Retikulo-Endothelialen Systems. Aufgrund der niedrigen HDL-Spiegel

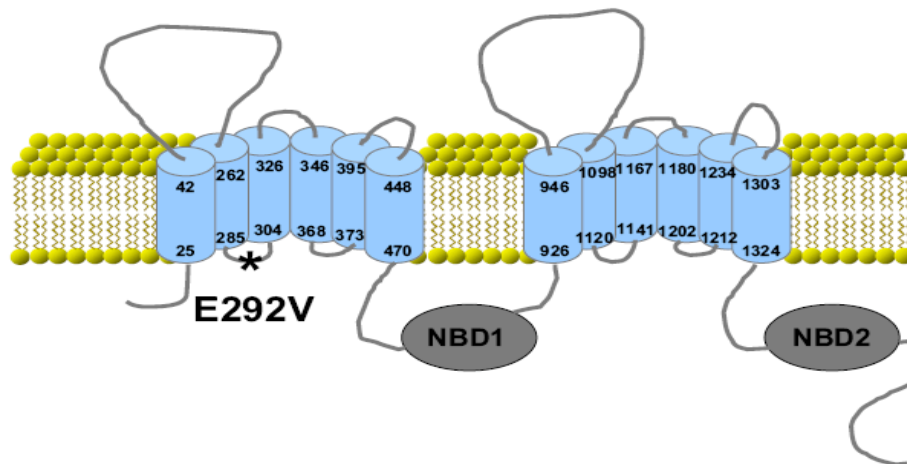
beziehungsweise des vollständigen Fehlens von HDL kommt es bei den betroffenen Patienten in frühen Jahren zu Atherosklerose und peripherer Neuropathie (Serfaty-Lacrosniere C and Janus ED 1994, Bodzioch M 1999). Aufgrund der hohen epidemiologischen Relevanz von Erkrankungen im Zusammenhang mit einem gestörten Lipidstoffwechsel wurde dieses Protein schon exzessiv beforscht. ABCA4 gehörte zu den ersten ABCA-Proteinen welches mit einer erblichen Erkrankung in Verbindung gebracht wurde (Allikmets R 1997). Es handelt sich hierbei um ein ABC Transporterprotein, welches Retina-spezifisch ist und als Substrat N-Retinylidene-Phosphatidylethanolamin über die Membranen von Photorezeptorzellen befördert. Mutationen im *ABCA4*-Gen resultieren in einer juvenilen Makuladegeneration, welche auch als Stargardt-Krankheit bezeichnet wird (Allikmets R 1997).

Das Protein ABCA12 wurde jüngst in Zellen der menschlichen Plazenta entdeckt (Annalo T 2002). Mutationen im *ABCA12*-Gen können zu Verhornungsstörungen der Haut führen. Für zwei Typen dieser so genannten Ichthyosen, nämlich der Lamellären Ichthyose Typ 2 und der Harlequin Ichthyose, konnte so eine genetische Ursachen der Erkrankung nachgewiesen werden (Lefevre S 2003, Kelsell DP 2005). ABCA12 scheint hierbei für den Export von Sphingolipiden aus einem als lamelläre Granula (Lamellar Granules) bezeichneten Zellorganell in Keratinozyten verantwortlich zu sein (Akiyama M 2005).

### 1.5 Das ABCA3-Protein

Im Jahr 1996 wurde das ABCA3-Protein von N. Klugbauer und F. Hofmann in der Zelllinie eines humanen medullären Schilddrüsenkarzinoms im Rahmen von Expressionstudien entdeckt (N. Klugbauer 1996). Es handelt sich hierbei um ein 1704 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 190 kDa. Entsprechend der Grundstruktur der ABC-Proteine handelt es sich um einen Volltransporter mit 12 Transmembranregionen und 2 nukleotid-bindenden Domänen auf zytoplasmatischer Seite. Das Protein wird von einem einzigen Gen codiert: Das humane *ABCA3*-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 in der Region 13.3. Physiologisch wird ABCA3 in Zellen des Gehirns, des Herzen, sowie des Pankreas gebildet. Die höchste Expression findet jedoch im Lungengewebe statt (Mulugeta S. 2002). Die Expression im Lungengewebe steigt mit zunehmenden Gestationsalter und erreicht sein Maximum um die Geburt herum (Mulugeta S. 2002). Bei *in-vitro*-Versuchen konnte zudem eine Hochregulation bei Glucocorticoidgabe gezeigt werden (Yoshida I 2004).

Das Protein ABCA3 befindet sich in der Außenmembran eines als Lamellarkörperchen bezeichneten Zellorganells von Alveolarepithelzellen Typ II (AT II) Zellen in der Lunge. Hier konnte es mithilfe eines gegen diese Struktur gerichteten Antikörpers sowohl beim Menschen als auch bei Ratten und Mäusen nachgewiesen werden. Zunächst als LBM 180 (von lamellar body membrane 180 kDa) bezeichnet wurde es bald als ABC-Protein der Subgruppe A3 identifiziert. (Yamano G. 2001, Mulugeta S. 2002).



**Abbildung 1.4.:** Schematische Darstellung des ABCA3-Proteins in der Lipiddoppelschicht (gelb). Entsprechend dem Grundprinzip der ABC-Proteine besteht der Transporter aus zwei Transmembrandomänen (blau) und zwei nukleotidbindenden Domänen (NBD). Mit einem Stern ist die häufigste bisher bekannte Mutation bezeichnet. (aus Bullard „ABCA3 Deficiency: Neonatal Respiratory Failure and Interstitial Lung Disease“)

### 1.5.1 Surfactant und ABCA3

Die AT II-Zellen bilden im Verbund mit den im Vergleich flacheren Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) Typ I die Auskleidung der Alveolen, welche die für den Gasaustausch entscheidenden Abschnitte der Lunge darstellen. Die AT II Zelle spielt dabei eine zentrale Rolle im Metabolismus eines als Surfactant bezeichneten Stoffgemisches, welches die Oberflächenspannung der Lunge herabsetzt. Die Funktionen liegen in der Bildung, der Lagerung, dem Recycling und gemeinsam mit den Alveolarmakrophagen im Katabolismus des Surfactant.

Der Surfactant wird im Endoplasmatischen Retikulum von AT II-Zellen synthetisiert und über den Golgi Apparat zu den Lamellarkörperchen transportiert. Das Lamellarkörperchen ist ein vermutlich von den Lysosomen abgeleitetes Organell (Bullard JE 2006) und enthält konzentrische, zwiebelschalenartig angeordnete Membranen, welche das Surfactant umgeben. Es wird durch die Fusion verschiedener Multivesikularkörper gebildet. Die Freisetzung in den alveolaren Raum erfolgt in Form von Exozytose, indem also die Membran des Zellorganells mit der äußeren Zellmembran fusioniert und den Protein-Phospholipidfilm so nach außen trägt. Im Anschluss breitet sich dieser über die Oberfläche der gesamten Alveole aus. Der alveoläre Flüssigkeitsfilm enthält ein Gemisch aus Proteinen und Lipiden. Den grössten Anteil bilden hierbei die Phospholipide. Der zusätzliche

geringere Anteil von (Apo-) Proteinen kann anhand des unterschiedlichen Molekulargewichtes differenziert werden. Surfactantprotein A und die hochmolekulare Form von Protein D haben eine besondere Funktion in immunregulatorischen Prozessen des Lungengewebes. Die Formen B und C (SP-B, SP-C), welche stark hydrophobe und niedermolekulare Eigenschaften besitzen verringern die Oberflächenspannung der Alveolen und wirken so einer endexpiratorischen Atelektase von Teilen des Lungengewebes entgegen. Die genaue Zusammensetzung des Surfactant ist hierbei von entscheidender Bedeutung für die Funktion der Lunge. Zudem nehmen beide Proteine eine Schlüsselstellung in der Funktion und im Metabolismus des Surfactant ein: Sie ermöglichen und erleichtern eine Verteilung des Surfactant entlang der Luft-Flüssigkeits-Grenze (Weaver TE 2001). Für einen Teil der Erkrankungen, welche auf einem genetisch bedingten Mangel an Surfactant beruhen, sind Mutationen in den Proteinen Surfactant-Proteinen B und C ursächlich.

### **1.5.2 Surfactantmangel und seine genetisch bedingten Ursachen**

Im Verlauf münden viele dieser Mutationen in einer Erkrankung der Lunge in der Neonatalperiode oder in einer interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD) des älteren Kindes.

Diese höchst heterogene Gruppe von Erkrankungen zeigt eine variable klinische Manifestation und ein unterschiedliches histopathologisches Ausmaß an interstitieller und alveolärer Entzündungsreaktion (Fan LL 1992, Fan LL 1993). Das pathologische Bild des Lungengewebes von Kindern mit milden *ABCA3*-Mutationen entspricht dem eines an einer ILD erkrankten Kindes. Die meisten Formen dieser Erkrankung weisen jedoch keine klare genetische Grundlage auf.

Angeborener SP-B-Mangel war dagegen die erste bekannte genetische Ursache eines Surfactant-Mangel-Syndromes (Nogee LM 1993). Die von einer Mutation im SP-B Gen (*SFTPB*) betroffenen Kinder leiden an einer besonders schweren Form der ILD und versterben häufig innerhalb von 3 Monaten trotz maximaler Therapie (Nogee 2004). Das Protein SP-B wird über verschieden proteolytische Prozessierungsschritte in die endgültige Größe von 79 AS überführt. Die Expression erfolgt sowohl in AT II Zellen als auch in Epithelzellen der Bronchiolen, wobei nur in den Typ II Zellen die endgültigen translatorischen Prozesse für ein funktionelles Protein stattfinden können.

Surfactantprotein C ist das einzige Surfactant-assoziierte Protein welches ausschließlich in den AT II Zellen exprimiert wird (Phelps DS 1991). Es handelt sich um ein 3,5 kDa großes Protein welches von einem einzigen Gen auf Chromosom 8 kodiert wird (*SFTPC*). Zunächst liegt eine Precursor Form vor (Conkright JJ 2001), wobei die endgültigen proteolytischen Arbeitsschritte im Lamellarkörperchen stattfinden (Weaver 1998). Phänotypisch zeigt SP-C-Mangel eine große Bandbreite im klinischen Bild und im Manifestationsalter der Patienten. Das Spektrum reicht hierbei von meist milden Formen der Atemwegserkrankungen im Neugeborenenalter bis zur ILD im Kindes- und Erwachsenenalter.

SP-B und SP-C werden gemeinsam zu den Lamellarkörperchen der AT II Zelle transportiert, wo die (Zwischen-) Lagerung von Surfactant stattfindet. Die Exozytose erfolgt mit dem gesamten Lamellarkörperchen in den Alveolarraum.

	SP-B Mangel	SP-C Mangel	ABCA3 Mangel
Begin der Erkrankung	Geburt	Geburt- Erwachsenenalter	Geburt- Kindheit
Erbgang	Rezessiv	Dominant/ Sporadisch	Rezessiv
Mechanismus	„Loss of function“	„Gain of function“	„Loss of function“
Verlauf	Letal	Variabel	Häufig letal, ggf. chronisch
Elektronenmikroskopische Darstellung	Desorganisierte Lamellarkörperchen	Zytoplasmatische dichte Anreicherungen	Schmale, elektronen- dichte Teilchen

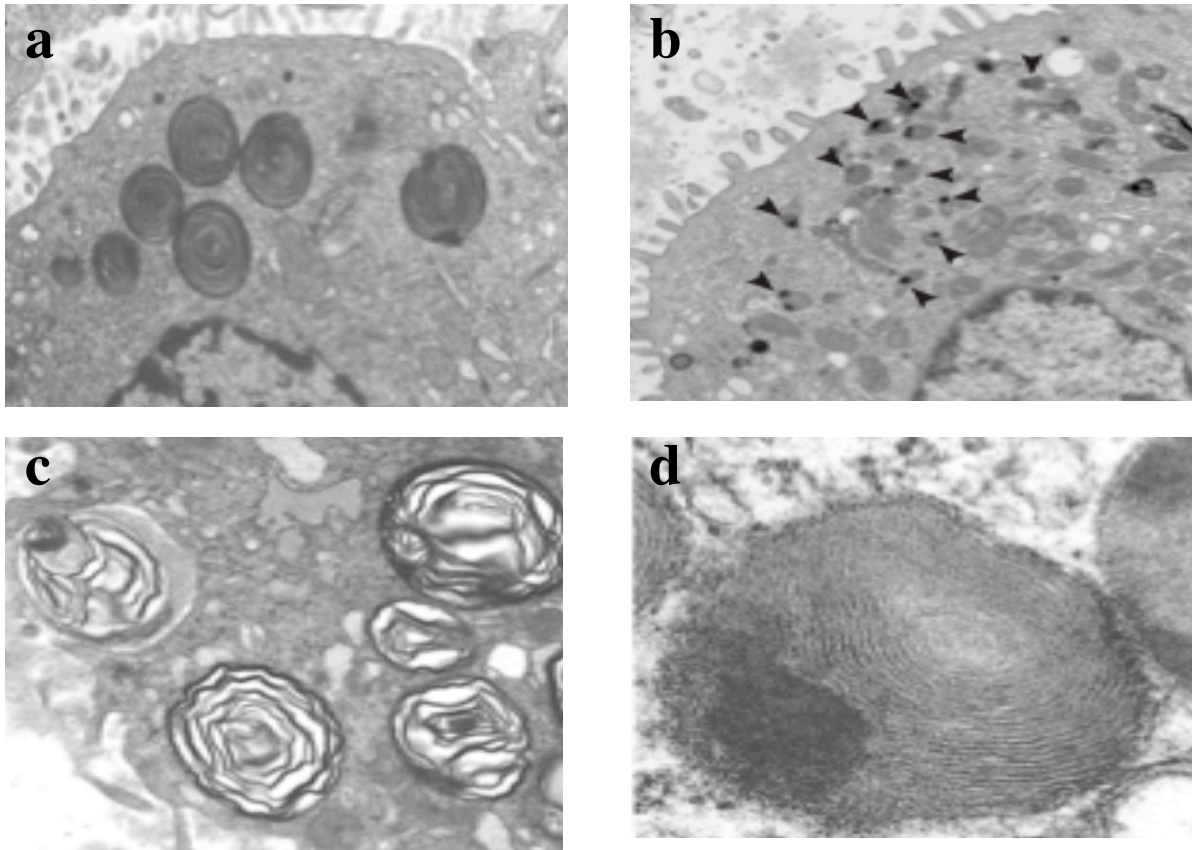
**Tabelle 1.2:** Vergleich unterschiedlicher Surfactant-Mangelsyndrome (aus „Genetic Disorders of Surfactant Proteins“ Neonatology 2005).

### 1.5.3 Das histopathologische Bild bei Surfactant-Mangel

Histopathologische Untersuchungen der Lunge bei Patienten mit bekannten *ABCA3*-Mutationen konnten eine Hyperplasie der Alveolarepithelzellen Typ II nachweisen. Zudem zeigten sich unterschiedlich ausgeprägte Veränderungen im Interstitium des Lungengewebes und prominente schaumige Makrophagen im Alveolarraum oft eingebettet in einem proteinösen Material. Im Verlauf kann es auch zu einem fibrösen Umbau der Lunge kommen (Shulenin S 2004). Histologisch können diese Formen der Erkrankung als „chronic pneumonitis of the infancy (CPI)“, „desquamative interstitial pneumonitis (DIP)“ und „nonspecific interstitial pneumonitis (NSIP)“ bezeichnet werden (Bullard J 2006). Dieses Bild ist jedoch nicht spezifisch für *ABCA3*-Mangel sondern zeigt sich genauso bei Patienten mit *SFTPB* und *SFTPC*-Mutationen.

Auf elektronenmikroskopischer Ebene stellt sich der *ABCA3*-Mangel mit dem Fehlen von normal geformten Lamellarkörperchen dar. Die Organellen zeigen ein schmales dichtes Bild mit exzentrisch gelegenen elektronendichten Einschlüssen, welche ein spiegeleiartiges Aussehen haben (Shulenin S 2004, Tryka AF 2000). Bei in vitro Transfektionsversuchen von Wild-Typ *hABCA3* wurde zudem die Erfahrung gemacht, dass diese *ABCA3*-Überexpression die Bildung von Lamellarkörperchen stimulieren können (Nagata K 2004).

Diese Beobachtung spricht für die Hypothese, dass *ABCA3* für die Biogenese von normalen Lamellarkörperchen notwendig ist. Das elektronenmikroskopische Bild unterscheidet sich von der Darstellung der Lamellarkörperchen bei SP-B-Mangel: hier beinhalten die AT II-Zellen große unförmige Körperchen mit vesikulären Einschlüssen (de Mello DE 1994).



**Abbildung 1.5:** a: Elektronenmikroskopische Aufnahme von gesundem Lungengewebe mit normal geformten Lamellarkörperchen in einer Vergrößerung x15 000. b: Lungengewebe bei einem Patienten mit homozygoter ABCA3-Mutation. Die Lamellarkörperchen stellen sich schmäler und dichter dar. Vergrößerung x15 000. c: Normal geformte Lamellarkörperchen in einer Vergrößerung x50 000. Es zeigt sich eine konzentrische, zwiebel-schalenartige Anordnung. d: Zytoplasmatische Einschlüsse mit dicht gepackten konzentrischen Membranen bei ABCA3-Mutation in einer Vergrößerung x150 000. (a und b aus Shulenin „ABCA3 Gene Mutations in Newborns with Fatal Surfactant Deficiency“ N Engl J Med 2004 S 1302. c und d aus Edwards „Ultrastructure of Lamellar Bodies in Congenital Surfactant Deficiency“ Ultrastructural Pathology 2005 S 508.6)

### 1.5.4 Klinisches Bild bei ABCA3-Mangel

Die genaue Funktion von ABCA3 ist unbekannt. Da jedoch andere Mitglieder der ABCA-Familie wie zum Beispiel ABCA1 oder ABCA4 in entscheidende Vorgänge des Lipid-Stoffwechsels eingebunden sind, die Lage des Proteins in der Außenmembran des Lamellarkörperchen ist und Lipide die ATPase Aktivität nachweislich induzieren können (Nagata K 2004), wurde früh die Hypothese aufgestellt, dass ABCA3 Phospholipide in einer für die Funktion des Surfactant wichtigen Weise beeinflusst.

Um diese Hypothese zu bestätigen wurde das ABCA3 Gen bei einer Gruppe von 21 Neugeborenen sequenziert, deren Auswahl anhand einer hohen Wahrscheinlichkeit für einen genetisch bedingten Surfactant Mangel erfolgte (Shulenin S 2004). Die Kohorte bestand daher aus termingeborenen Kindern, welche sich mit den klinischen und radiologischen Zeichen eines RDS präsentierten und anamnestisch in der Familie schon Fälle von dieser Erkrankung im Neugeborenenalter bekannt waren. Bei insgesamt 16 der 21 Kinder konnten so Mutationen im *ABCA3*-Gen gefunden werden. Hierin eingeschlossen Kinder welche homozygot für nonsense Mutationen waren und daher gar kein ABCA3 exprimieren konnten. Die verhältnismäßig hohe Zahl von Mutationen in der untersuchten Gruppe legt daher die Vermutung nahe, dass ABCA3-Mangel im Vergleich zu den bekannten genetischen Ursachen für Surfactant-Mangel wie SP-B-Mangel oder Mutationen im *SFTPC* häufiger auftritt. Dafür spricht auch die Tatsache, dass ABCA3 mit 1704 AS im Vergleich mit SP-B (79 AS) oder SP-C (34 AS) sehr viel größer ist und dem entsprechend die Wahrscheinlichkeit für Fehler in der DNA-Replikation steigt.

Ein Patient in dieser Studie überlebte die Neonatalperiode, was die Vermutung nahe legt, dass einige ABCA3 Mutationen in milderer Formen der Lungenerkrankung resultieren. Hierfür spricht auch die Ähnlichkeit im histopathologischen Bild der Lunge zwischen termingeborenen Kindern mit ABCA3-Mangel und älteren Kindern mit unterschiedlichen Formen der ILD. Eine in diesem Zusammenhang durchgeführte Studie bei 4 Kindern mit histologisch diagnostizierter DIP zeigte eine Punktmutation auf einem Allel mit der Aminosäure Valin anstelle Glutaminsäure bei 3 Kindern (E292V). Von 150 weiteren Kindern mit chronischen Lungenerkrankungen zeigten 7 die Mutation E292V. Eine zweite *ABCA3*-Mutation auf dem anderen Allel konnte bei 5 Kindern nachgewiesen werden. Das zur Kontrolle durchgeführte Screening von 200 Allelen von Personen ohne Lungenerkrankung zeigte hierbei, dass diese Mutation kein häufiger Polymorphismus ist (Bullard JE 2005).

Im Knock-Out-Modell bei der Maus für *ABCA3*, welches kürzlich veröffentlicht wurde, kam es zu einem raschen Versterben des Tieres kurz nach der Geburt aufgrund einer respiratorischen Insuffizienz. Analysen der Lunge erbrachten ein Fehlen von Surfactant, ein Verlust von

vollentwickelten Lamellarkörperchen und zeigten einen massiven Verlust an Phosphatidylglycerol (Fitzgerald ML 2006).

Diese Beobachtungen konnten auch von unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden: Die Mäuse, welche homozygot für die entsprechenden Allele (ABCA3  $-/-$ ) waren, verstarben innerhalb einer Stunde nach Geburt. ABCA3  $-/-$  Neugeborene zeigten Atelektasen der Lunge im Vergleich zur normalen Gasverteilung bei gesunden Tieren und den heterozygoten Tieren (Hammel M 2007).

## 1.6 Targetingsignale von Transmembranproteinen zu Endo- und Lysosomen

Das Lamellarkörperchen ist ein von den Lysosomen abgeleitetes Organell. Lysosomen sind membrangebundene zytoplasmatische Organellen, die in den intrazellulären Proteinabbau eingebunden sind. Sie beinhalten eine Mischung von sauren Hydrolasen und glykosilierten integralen Membranproteinen (Dell'Angelica EC 2000). Die meisten Eigenschaften der Lysosomen werden auch von der Gruppe der lysosomal abgeleiteten Organellen geteilt. Zusätzlich zu den lysosomalen Proteinen enthalten diese Organellen zelltypspezifische Komponenten, welche für die spezialisierten Funktionen der Zellen notwendig sind.

In Targetingstudien mit Wildtyp ABCA3 in humane Lungenzellen konnte nachgewiesen werden, dass das Protein sowohl zu den Lamellarkörperchen als auch zu den Lysosomen gebracht wird (Cheong N 2006). Im Fall von eingebauten bekannten Mutationen, welche bei RDS vorkommen, verbleibt das Protein im endoplasmatischen Retikulum.

Der Transport von Transmembranproteinen zu Endosomen und Lysosomen wird soweit bekannt über Signale vermittelt, welche innerhalb der cytosolischen Domäne dieser Proteine liegen (Bonifacino J. S. 2003). Die meisten Signale enthalten eine kurze, lineare Sequenz von Aminosäureresten. Diese Transportsignale können in zwei große Klassen unterteilt werden: Auf der einen Seite die auf Tyrosin basierten Signale, welche die Konsensus-Motive NPXY und YXX $\emptyset$  enthalten. Auf der anderen Seite enthalten die Signale zweimal die Aminosäure Leucin und werden somit als Dileucin-basiert (Dileucin-based) bezeichnet. Die Konsensus Sequenz dieser Proteine lautet (DE)XXXL(LI) oder DXXLL. Beide Gruppen von Signalen werden von Strukturen des Proteinmantels erkannt, welcher sich auf der zytoplasmatischen Seite der Membran des Zellorganells befindet.

YXX $\emptyset$  und (DE)XXXL(LI) Signale werden von spezifischen Adaptor Protein (AP1-4) Komplexen erkannt. DXXLL Motive werden von einer Proteinfamilie erkannt, welche als „golgi-localizing gamma-adaptin ear homology domain ADP-ribosylation factor-binding“ (GGA) bezeichnet werden. Zu den Erkrankungen, welche auf einer Fehlverteilung lysosomaler Proteine beruhen, wird auch das Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS) gezählt. Diese Erkrankung führt letztlich zu einem fibrösen Umbau der Lunge und kann zu einem Atemnotsyndrom des Neugeborenen führen.



## 2. Zielsetzung und Aufgabenstellung

Der Surfactant-Mangel bei Frühgeborenen stellt eine der häufigsten Erkrankungen der Neonatalperiode dar. Mutationen im *ABCA3*-Gen gehören zu den jüngst bekannt gewordenen genetischen Ursachen von Störungen im Surfactant-Stoffwechsel bei reifgeborenen Kindern.

Die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge auf Proteinebene sind bisher wenig untersucht und daher weitestgehend unverstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es das *ABCA3*-Protein auf zellulärer Ebene zu untersuchen und das Targetingmotiv des Proteins einzugrenzen.

Aufgrund des hohen Konservierungsgrades zwischen den homologen *ABC*-Genen gingen wir in Hinblick analoger Versuchsreihen zur Targetingsequenz im *ALD*-Gen (*ABC-D1*) zunächst von einer N-terminalen Lokalisation aus.

Aus diesem Zusammenhang ergab sich die folgende Aufgabenstellung:

1. Entwicklung eines geeigneten Zellkultursystems zur Expression von rekombinantem *ABCA3*.
  - 1.1 Untersuchungen zur subzellulären Verteilung des Transporters durch Klonierung von h*ABCA3* in Expressionsvektoren zur Expression als Fusionsprotein in einem geeigneten Zellsystem.
  - 1.2 Klonierung der kodierenden Sequenz des Surfactant-Protein C in einen Expressionsvektor zum Nachweis eines korrekten Targeting zum Zielorganell.
2. Definition der kürzesten Proteinsequenz im *ABCA3*-Transporter, welche für ein korrektes Targeting an das Zielorganell ausreichend ist.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden**

##### **3.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung eines gewünschten DNA-Abschnittes. Mithilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase und einem der zu amplifizierenden DNA komplementären Primerpaar können multiple Kopien der DNA hergestellt werden. Um sicherzustellen dass die DNA-Doppelstränge getrennt sind, muss die DNA-Matrize (Template) zur Initialisierung zunächst auf 96°C erhitzt werden. Anschließend wird die Temperatur zur spezifischen Anlagerung (Annealing) der Oligonukleotidprimer an die DNA reduziert. Die genaue Temperatur ergibt sich hierbei aus der Länge und Sequenz der Primerpaare. Die eigentliche Neusynthese bzw. Elongation erfolgt mithilfe der Taq-Polymerase in 5'→3' Richtung. Der Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung wird 20-30 mal wiederholt, wobei die neu gebildeten Stränge im nächsten Zyklus selbst als DNA-Matrizen dienen. Zur Amplifikation kürzerer Fragmente und für einfache Test-PCRs wurde bei dieser Arbeit die Taq-Polymerase verwendet. Zur Vervielfältigung von längeren Genabschnitten wurde das Long Template-System von Roche (Mannheim) benutzt. Es ermöglicht die zuverlässige Synthese von längeren Gensequenzen bis 5 kb und minimiert durch seine Proofreading-Aktivität die Fehlerquote.

Alle so gefertigten PCR-Produkte wurden im Anschluss an die Reaktion auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

##### **3.1.2 Herstellung von Oligonukleotiden**

Für die Erstellung der Primer wurden Sequenzen einer Länge von 20-30 Nukleotiden ausgesucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass zwischen den einzelnen Oligonukleotiden keine Komplementarität besteht und sich so keine Dimere ausbilden können. Zudem wurde ein ausgewogenes Verhältnis zwischen A und T sowie G und C angestrebt. Für die weiteren Klonierungsschritte wurden zusätzlich Nukleotidsequenzen für die verschiedenen Restriktionsenzyme eingebaut. Im Falle der Targetingkonstrukte wurde der Stopp (TGA) am Ende der für ABCA3 codierenden Sequenz mutiert. Die PCR-Produkte wurden später in die Expressionsvektoren kloniert.

**Tabelle 3.1** Primer für die Erstellung des Fusionsproteins SPC/pECFP-C1. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind jeweils kursiv gedruckt.

Name	5'→3' Sequenz
XhoI F	ATCTCGAGAATGGGCAGCAAAGAGGTCCTG
EcoR I R	ATGAATTCCTAGATGTAGTAGAGCGGCAC

**Tabelle 3.2** Primer für die Herstellung des Fusionsproteins ABCA3/pEYFP-N1

Name	5'→3' Sequenz
Bgl F	GAGCCAGATCTCGCTGGAACAGGTC
AgeI R	ATACCGGTAGTCGCCCCTCCTCTGCGGTGG

Zusätzlich zu diesen Vollängenprodukten wurden für die Targetingstudien auch verkürzte Sequenzen erzeugt. Diese umfassen einen definierten Bereich des N-Terminus des Proteins ABCA3.

**Tabelle 3.3** Primer für die verkürzten Produkte aus ABCA3

Name	5'→3' Sequenz
EcoRI F (1)	TAGAATTCATGGCTGTGCTCAGGCAGCTG
EcoRI F (2)	TAGAATTCATGGTCCTGGTGACGGTCCTG
AgeI (1) R	ATACCGGTCCGAAGTGCCTGGGAAGACGG
AgeI (2) R	ATACCGGTTTTGGCTTACCTTGACACAGA
AgeI (3) R	ATACCGGTAAGTCCTTCTCGGAGGGAAAGC
AgeI (4) R	ATACCGGTGCAAGCTCCCAGGTGTCTCCTG
AgeI (5) R	ATACCGGTGACTGGCCCGGGTAGATGGTGG
AgeI (6) R	ATACCGGTTTCAAGCGGAGCCAGATGAGGA

Die Ansätze für die PCR Reaktion:

1 µl Template (In der Verdünnung 1:100 in aqua bidest.)  
 1 µl Primer forward (100 pmol, 1:10 Verdünnung einer 10 pmol Lsg.)  
 1 µl Primer reverse (100 pmol, 1:10 Verdünnung einer 10 pmol Lsg.)  
 5 µl Expand High Fidelity-Puffer (10fach)  
 0,8 µl Expand High Fidelity-Polymerase  
 1 µl Desoxyribonukleotid-Mischung (dNTPs)  
 40,2 µl aqua bidest.

---

ad 50 µl Gesamtvolumen

### Programmierung des Thermocycler:

Programm mit Expand-High-Fidelity-Polymerase:

- |                             |                        |
|-----------------------------|------------------------|
| 1. 95°C                     | Premelting 5 min       |
| 2. 95°C                     | Melting 1 min          |
| 3. 50-55°C                  | Annealing 30 s         |
| 4. 68°C                     | Elongation 40 s        |
| <i>dann 30 Zyklen ab 2.</i> |                        |
| 5. 68°C                     | Final Elongation 4 min |
| 6. 4 °C                     | Hold                   |

Programm mit Standard-Taq-Polymerase:

- |                             |                        |
|-----------------------------|------------------------|
| 1. 95°C                     | Premelting 5 min       |
| 2. 95°C                     | Melting 1 min          |
| 3. 50-55°C                  | Annealing 30 s         |
| 4. 72°C                     | Elongation 30 s        |
| <i>dann 30 Zyklen ab 2.</i> |                        |
| 5. 68°C                     | Final Elongation 4 min |
| 6. 4°C                      | Hold                   |

### **3.1.3 Aufreinigung der PCR-Produkte**

Als Vorbereitung auf den enzymatischen Verdau wurden die PCR-Produkte unter Verwendung des Qiaquick PCR Purifikation Kit (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. Hierbei wird die zu reinigende DNA bei hoher Salzkonzentration an eine spezielle Silikatmatrix gebunden, wobei die Größe der adsorbierten DNA Fragmente abhängig vom Puffer ist: niedermolekulare Produkte oder Primer können so entfernt werden. Folgendes Protokoll kam zur Anwendung:

250µl PB-Puffer werden zu 50 µl PCR-Reaktion gegeben (Bindung).

Die Probe wird auf „QIAquick spin“ Säule aufgetragen.

1 Minute lang bei 14000 U/min zentrifugieren und den Überstand verwerfen.

750 µl PE-Puffer zum Waschen auf die Säule geben (Reinigung).

1 Minute lang bei 14000 U/min zentrifugieren und den Überstand verwerfen.

15 Minuten lang mit geöffnetem Deckel bei 37°C inkubieren.

Mit 50 µl EB-Puffer kurz inkubieren, dann

zur Elution 1 Minute bei 14000 U/min zentrifugieren.

### **3.1.4 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen**

Die gereinigten PCR-Produkte wurden einem Restriktionsverdau unterzogen, um eine Klonierung in den Zielvektor zu ermöglichen. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen spalten. Bei einfacher Spaltung von Plasmid-DNA entsteht hierbei ein linearisierter Vektor, welcher anschließend mit komplementär geschnittenen DNA-Fragmenten ligiert werden kann.

Für die gleichzeitige Verwendung von zwei unterschiedlichen Enzymen wurde, soweit dies möglich war, ein für beide Enzyme optimaler Puffer eingesetzt. Bei Inkompatibilität erfolgte ein serieller Verdau der Plasmide.

Bei dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen mit den entsprechenden Puffern der Firmen Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Ipswich, USA) verwendet.

**Tabelle 3.4:** Die verwendeten Restriktionsenzyme und die jeweiligen Vektoren.

Vektor	Insert	Restriktionsenzym 1	Restriktionsenzym 2
pECFP-C1	SPC	XhoI	EcoRI
pEYFP	ABCA3	Eco47III	XhoI
		EcoRI	ApaI
		BglII	AgeI
	ABCA3 Verkürzt	EcoRI	AgeI

Restriktionsansatz für die PCR-Produkte:

10 µl Probe  
2 µl Puffer  
1 µl BSA  
1 µl Restriktionsenzym 1  
1 µl Restriktionsenzym 2  
5 µl aqua bidest

---

20 µl Gesamtvolumen

Restriktionsansatz für die Vektoren:

5 µl Vektorprobe  
2 µl Puffer  
1 µl BSA  
1 µl Restriktionsenzym 1  
1 µl Restriktionsenzym 2  
10 µl aqua bidest

---

20 µl Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde 3 Stunden lang bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem Qiaquick PCR Purifikation Kit aufgereinigt. .

### 3.1.5 Agarose Gelelektrophorese von DNA

TBE-Puffer 10x (pH 8.3)

1 M Borsäure (Sigma, Steinheim)  
1 M Tris-HCl (Sigma, Steinheim)  
200 mM EDTA (Sigma, Steinheim)

Mit dieser Methode wurden analytische DNA-Mengen nach der PCR-Reaktionen oder Restriktionsverdau sowie präparative DNA-Mengen zur Isolierung des Inserts aufgetrennt. In Abhängigkeit von der Grösse der zu trennenden Fragmente wurden 0.7- 2%-ige Agarosegele (Biozym Diagnostics, Hessisch Oldendorf) in 1x TBE-Puffer hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Agarosemenge in der Hälfte des benötigten Puffers durch Erhitzen bis zur Siedetemperatur gelöst und nach Abkühlen mit dem verbleibenden Puffer und mit etwa 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt.

Dieser Gelmix wurde zur Polymerisation zügig in den Gelträger gegossen. Nach 30 -60 Minuten Abkühlung bei Raumtemperatur konnte das Gel benutzt werden. In der Gelkammer wurde es mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 5 -10  $\mu$ l „Gel-Loading-Solution“ (Sigma, Steinheim) vermischt, aufgetragen und bei 45 -100 mA elektrophoretisch getrennt. Auf einem UV-Durchlichttisch (366 nm) konnten die durch Interkalation von Ethidiumbromid mit der DNA durch Fluoreszenz sichtbar gemachten Banden fotografisch dokumentiert werden. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch den Vergleich mit einem DNA-Standard-Marker.

### 3.1.6 Dephosphorylierung der Vektor-DNA

Die Calf Intestinal Phosphatase (CIP, 10 Units/ $\mu$ l; Amersham Biosciences Europe, Freiburg) katalysiert die Entfernung der 5'Phosphatgruppe von DNA, RNA sowie Ribo- und Desoxyribonukleosidtriphosphaten. Dadurch wird eine Religation von nur einfach geschnittener Vektor-DNA über die so entstandenen „sticky-ends“ verhindert. Die Dephosphorylierung von Vektor-DNA wurde direkt im Anschluß an den Restriktionsverdau durchgeführt. Die Ansätze enthielten folgende Komponenten:

20 $\mu$ l Restriktionsverdau Vektor	
0,7 $\mu$ l CIP	
0,3 $\mu$ l Restriktionsenzym 1	
0,3 $\mu$ l Restriktionsenzym 2	
0,8 $\mu$ l Puffer	
2,9 $\mu$ l Aqua bidest	
<hr/>	
25 $\mu$ l Gesamt	

Der Ansatz wurde 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem Qiaquick Purifikation Kit gereinigt.

### 3.1.7 Herstellung von blunt-end DNA-Fragmenten

Durch die Behandlung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen entstehen DNA-Fragmente, die entweder bündige Enden (blunt-end), oder 5'/ 3'überhängende Enden (sticky-end) besitzen. Für die Herstellung der Konstrukte war es notwendig, eine Schnittstelle im Zielvektor pEYFP-N1 zu entfernen. Nach dem Restriktionsverdau mussten die überhängenden Enden zur Herstellung von blunt-ends aufgefüllt und anschließend durch die T4-Ligase verbunden werden.

### 3.1.8 Auffüllen von DNA-Enden durch Behandlung mit dem Klenow-Enzym

Für das Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden wurde das große Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment aus *Escheria coli*) verwendet, welches nur noch die 5'→3' Polymerase und die 3'→5' Exonucleaseaktivität besitzt. Es kam das folgende Protokoll zur Verwendung:

5  $\mu$ l Vektor-DNA  
 3  $\mu$ l Puffer (10x)  
 5  $\mu$ l dNTP-Lösung (2mM)  
 0,5  $\mu$ l Klenow-Fragment (10u/ $\mu$ l)

Der Ansatz wurde 15 Minuten lang bei 25°C inkubiert. Anschliessend wurden 0,6  $\mu$ l einer 500 mM EDTA-Lösung zugesetzt und für 20 min bei 75°C inkubiert. Zum Abschluss erfolgte nach der Aufreinigung mit dem Qiaquick Purification Kit die Blunt-End-Ligation der Fragmente.

### 3.1.9 Ligation

Plasmid	Größe (kb)	Resistenz <i>E.coli</i>	Selektionsagens für Eukaryoten	Herkunft
pECFP-C1	4.7	Kanamycin	Neomycin	BD Clontech, San Diego, USA
pEYFP-N1	4.7	Kanamycin	Neomycin	BD Clontech, San Diego, USA

Insert	Größe (bp)	Herkunft
SPC	590	ImaGenes GmbH, Berlin
hABCA3	5115	Dr. Klugbauer

**Tabelle 3.5:** Größe und Herkunft der verwendeten Plasmide.

Restriktionsenzymatisch gespaltene und elektrophoretisch isolierte DNA-Fragmente konnten direkt in die komplementären Restriktionsschnittstellen des Vektors ligiert werden. Der Vektor war zu diesem Zweck teilweise dephospholarisiert worden (→3.1.5.).

Die Ligation von Vektor und Insert wurde in dieser Arbeit mithilfe der T4 DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Bei dieser Methode sollen (laut Herstellerangaben) Insert und Vektor im Verhältnis 3:1 eingesetzt werden. Je nach Vorhandensein von Blunt-Ends oder Sticky-Ends variierte das Protokoll für die Ligation:

Kohäsive Enden:

2  $\mu$ l Ligase Reaktion Buffer (5-fach)  
 1  $\mu$ l Vektor (30 fmol)  
 3  $\mu$ l Insert (90 fmol)  
 1  $\mu$ l T4 DNA Ligase  
 3  $\mu$ l aqua bidest

1 Stunde lang bei 25°C inkubieren

blunt ends:

2  $\mu$ l Ligase Reaktion Buffer (5-fach)  
 1  $\mu$ l Vektor ( 60fmol)  
 3  $\mu$ l Insert (180 fmol)  
 1  $\mu$ l T4 DNA Ligase  
 3  $\mu$ l aqua bidest

20 Stunden lang bei 14°C inkubieren

**3.1.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Diese Methode wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente zu isolieren und so weiteren Arbeitsschritten zugänglich zu machen. Hierfür wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) genutzt.

1. Gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente in einem Agarosegel.  
Die entsprechende Bande wird auf einem Transilluminator unter langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und abgewogen.
2. 3 Volumen QG-Puffer hinzufügen und 10 Minuten lang bei 50°C inkubieren.
3. Vortexen und 1 Gelvolumen Isopropanol zugeben.
4. Die Probe auf die Qiagen Quick-Spin Säule geben.
5. 1 min bei 10 000 U/min zentrifugieren.
6. Überstand verwerfen.
7. 0,5 ml QG-Puffer über die Säule laufen lassen und 1 Minute lang zentrifugieren.
8. 0,75 ml PE-Puffer auf die Säule geben und 1 min zentrifugieren.
9. Überstand verwerfen und 1 Minute lang zentrifugieren.
10. Abschließend bei 37°C 15 Minuten lang trocknen lassen und die DNA eluieren.

**3.1.11 Molekulargewichtsstandards für DNA**

Molekulargewichtsstandards sind Gemische verschiedener DNA-Stücke mit definierter Basenzahl zur Abschätzung der Masse von Proben in der Gelelektrophorese.

Marker 1 kb	Invitrogen (Karlsruhe)
Marker V	Roche (Mannheim)

**3.1.12 Aufreinigung von Plasmid DNA**

Zur Herstellung größerer Mengen von Plasmid-DNA werden transformierte *E. coli* DH5 $\alpha$ -Kulturen in einem Selektivmedium vermehrt und mit kommerziellen Plasmid-Aufreinigungskits wie dem



QIAprep miniprep-Kit (Qiagen, Hilden) oder dem Nucleobond Plasmid Purification Kit ( San Diego, USA) aufgeschlossen.

Analog dem Verfahren zur PCR-Purifikation handelt es sich um eine Reinigung durch Adsorption an Silikatmembranen bei hohen Salzkonzentrationen. Die so gebundene DNA wird nach der Entfernung der Salze mit entsprechenden Puffern mit Wasser eluiert oder mit Isopropanol präzipitiert.

Zur Herstellung einer Minikultur wurden 6 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion versetzt und anschließend mit einer isolierten Kolonie von der Agarplatte inokuliert. Für die Midipräparation wurden 50 ml LB-Selektiv-Medium mit 1 ml einer Vorkultur beimpft. Diese Kulturen wurden dann ca. 10 Stunden lang bei 750–900 rpm und 37 °C inkubiert. Nach der Reinigung mithilfe des QIAprep Miniprep Kit erfolgte die Elution der gebundenen DNA in 50 µl aqua bidest. während bei den Midipräparationen mit 3,5 ml Isopropanol präzipitiert wurde.

Das Präzipitat wurde dann bei 5000 U/min für 30 Minuten bei 4°C in einer Beckmann High Speed Zentrifuge ( mit JA20-Rotor) pelletiert. Im Anschluss wurde das Pellet mit 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation und Trocknung bei 37°C wurde das Pellet schliesslich in 100-200 µl TE-Puffer aufgenommen und einer DNA-Konzentrationsbestimmung unterzogen.

### **3.1.13 Herstellung von Glycerinkryokulturen (Glycerinstocks)**

Glycerinkryokulturen wurden aus den LB-Kulturen der Plasmidminipräparationen durch Zugabe von 500 µl 85%-igem Glycerin zu 500 µl der Bakteriensuspension hergestellt. Die Stocklösungen wurden gut gemischt und 24 Stunden lang bei -20 °C eingefroren. Die endgültige Lagerung erfolgte bei – 80°C.

### **3.1.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde in einem Biophotometer (Eppendorf) vorgenommen. Die Extinktionswerte wurden bei 260 nm und 280 nm gemessen und der Quotienten OD<sub>260/280</sub> ermittelt. Eine Extinktion (OD) von 1.0 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl. Auf der Grundlage dieser Definitionen wurden die Konzentrationen der jeweiligen Nukleinsäure errechnet. Der Quotient OD<sub>260/280</sub> ist hierbei ein Maß für die Protein- bzw. Salzkontamination und sollte optimal einen Wert zwischen 1,5-1,9 ergeben.

### **3.1.15 Transformation in chemisch kompetente *E. coli* DH5α**

Bei den für diese Arbeit verwendeten Bakterienstämmen handelt es sich um *Escheria coli* DH5α. Der relevante Genotyp hierbei lautet *supE44, ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17, recA1, gyrA96, thi-1, relA1* (Hanahan 1983; Bethesda Research Lab. 1986).

LB-Mediums (pH7,4):	10 g Tryptone (Oxoid, Basingstone, Hampshire, UK) 5 g Select Yeast Extract (Sigma, Steinheim) 10 g NaCl (Merck, Darmstadt) ad 950 ml aqua bidest. und Autoklavieren.
LB-Festagarplatten	15 g Agar (Invitrogen, Karlsruhe) ad 1l LB-Medium und Autoklavieren. bei 50°C 30 mg Kanamycin (Sigma, Steinheim) zugeben.

Für die Vervielfältigung der rekombinanten Plasmide wurden diese in transformationskompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  eingebracht. In diesen Stämmen wurden die Zellwände der Bakterien für die Transformation durchlässig gemacht. Im Anschluss erfolgte die Anzucht auf selektiven LB-Festagarplatten.

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde wie folgt vorgegangen:

1. 500  $\mu$ l einer Vorkultur mit *E. coli* DH5 $\alpha$  werden zu 25 ml LB-Medium gegeben und bei einer Temperatur von 37°C in einem Schüttler für 3 Stunden inkubiert, bis die optische Dichte bei 600 nm 0,6 bis 0,8 beträgt.
2. Die Zellen werden bei 3000 U/min und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert.
3. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 2 ml eiskühles CaCl (0,1 M) resuspendiert. Danach wird mit CaCl auf 10 ml aufgefüllt.
4. Die Zellen werden erneut 15 Minuten lang bei 4°C und 3000 U/min zentrifugiert.

Die Transformation erfolgt nach diesem Protokoll:

1. 3  $\mu$ l Plasmid DNA werden zu 100  $\mu$ l *E. coli* DH5 $\alpha$  gegeben und 30 Minuten lang auf Eis inkubiert.
2. Um die Bakterienzellen für die Transformation permeabel zu machen werden sie 1 Minute lang im Wasserbad bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen.
3. Anschliessend lässt man sie für 2 Minuten lang auf Eis abkühlen und gibt 200  $\mu$ l LB Medium hinzu.
4. Für die Expression des Resistenzgens wird der Ansatz 45 Minuten lang bei 37°C unter Schütteln inkubiert.
5. Die Suspension wird nun auf einer selektiven Agarplatte ausplattiert und 12-24 Stunden lang bei 37°C inkubiert.

### 3.1.16 PCR zum Nachweis erfolgreich transformierter Klone

Nach der Transformation der Plasmide in *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde zum Nachweis der korrekten Ligation ein PCR-Screening der Klone durchgeführt. Der Forward-Primer bindet hierbei eine DNA-Sequenz des Vektors, der Reverse-Primer dagegen im Bereich des Inserts.

Somit ist eine Amplifikation nur möglich, wenn das Insert im Vektor vorhanden ist.

Im Anschluss an die PCR erfolgte der Nachweis der erfolgreich amplifizierten Produkte mithilfe der Agargelelektrophorese.

5  $\mu$ l aqua bidest. mit einer Probe der suspendierten Klonkolonie  
 0,2  $\mu$ l Forward Primer ( Vektorprimer)  
 0,2  $\mu$ l Reverse Primer ( EcoRI Rev.)  
 0,2  $\mu$ l TAQ Polymerase  
 2  $\mu$ l 10xPuffer + dNTP  
 12,4  $\mu$ l aqua bidest.

#### PCR im Clonescreen Programm:

1.	94°C	Premelting	6 min
2.	94°C	Melting	40 s
3.	55°C	Annealing	40 s
4.	72°C	Elongation	40 s
ab 2. 24 Zyklen			
5.	4°C	Hold	

### 3.1.17 Restriktionsverdau zur Identifizierung transformierter Klone

Im Anschluss an die Prüfung der transformierten Bakterien mittels PCR wurden die Proben zur sicheren Charakterisierung einem Restriktionsverdau unterzogen.

Hierzu musste die entsprechende Kolonie zunächst in LB-Medium kultiviert, und daraus das Plasmid gewonnen werden. Die DNA wird folgendermassen verdaut:

5  $\mu$ l Plasmid-DNA  
 1  $\mu$ l Restriktionsenzym I  
 1  $\mu$ l Restriktionsenzym II  
 2  $\mu$ l Puffer  
 11  $\mu$ l aqua bidest.

Anschliessend erfolgte die elektrophoretische Analyse auf Agarosegel.

### 3.1.18 Sequenzierung der Produkte

Vor der Transfektion der Produkte erfolgte zunächst die Sequenzierung zur Bestätigung der richtigen Basenfolge. Hierbei wurde die auf dem Ketten Abbruch-Verfahren basierende Sequenzierreaktion von Sanger et al. (1975) verwendet. Bei diesem Verfahren werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosid-5'-Triphosphate (ddNTPs) zum Abbruch einer Polymerisationsreaktion eingesetzt. Mithilfe der Markierung ist es möglich die DNA-Syntheseprodukte anschließend im Polyacrylamid-Gel aufzutrennen. Für die Cycle-Sequenzierung wurden DNA-Mengen zwischen 150 ng und 200 ng pro  $\mu\text{l}$ -Ansatz zusammen mit  $1\mu\text{l}$  des entsprechenden Sequenzier-Primers ( $10\mu\text{M}$ ) und  $2\mu\text{l}$  BigDye-Mix aus dem Rhodamin dye terminator Kit von Applied Biosystems/ Perkin Elmer (Weiterstadt) verwendet:

2  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA  
 1  $\mu\text{l}$  Forwardprimer  
 2  $\mu\text{l}$  Ready Reaction Mix

#### PCR Programm zur Sequenzierung:

1.	95°C	Premelting	5 min
2.	95°C	Melting	15 s
3.	53°C	Annealing	15 s
4.	60°C	Elongation	4 min
<i>ab 2. 30 Zyklen</i>			
5.	4°C	Hold	

### 3.1.19 Präzipitation der DNA

Die Analyse der Sequenzier-Reaktion im Polyacrylamid-Gel wurden als Auftragsarbeiten bei der Firma Eurofins-Medigenomix (Martinsried) durchgeführt.

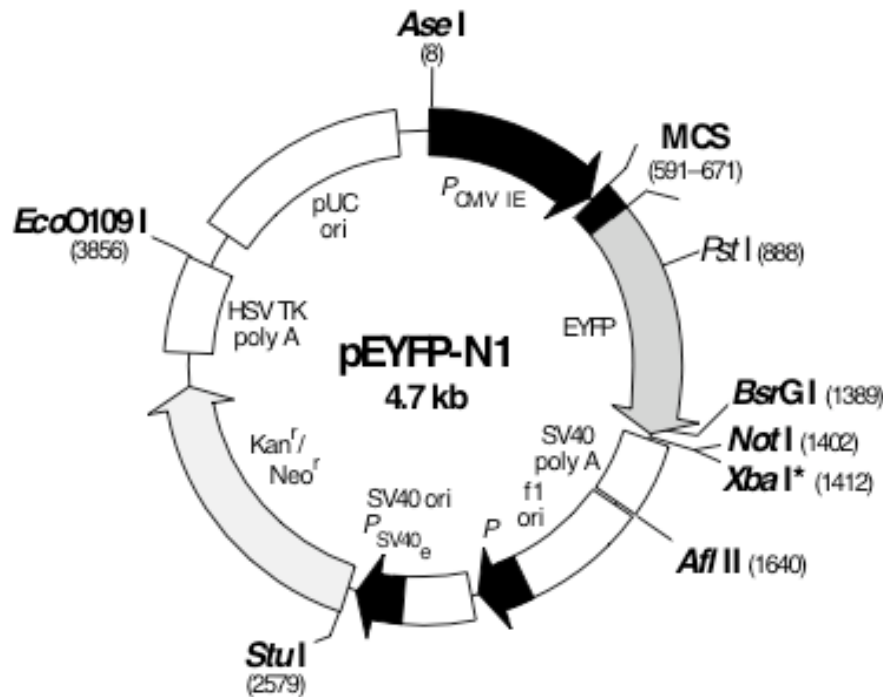
Hierfür war es zunächst notwendig, eine Präzipitation der DNA durchzuführen.

12,5  $\mu\text{l}$  100% EtOH  
 0,5  $\mu\text{l}$  NaOAc (3 M, pH 5,2)  
 Probe aufnehmen und Vortexen  
 20 min bei 14 000 U/min bei 4°C zentrifugieren  
 Überstand entfernen  
 90  $\mu\text{l}$  70 % EtOH hinzufügen  
 20 min 14 000 U/min zentrifugieren  
 EtOH abpipettieren und Trocknen

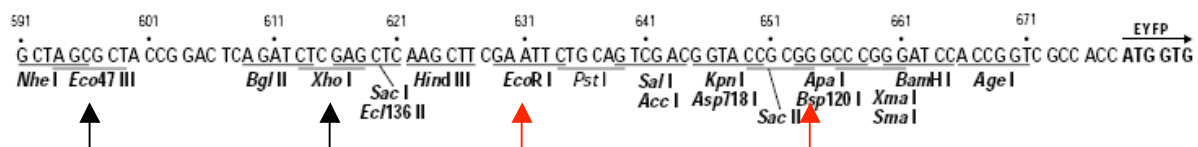
## 3.2 Herstellung von rekombinanten Plasmiden

### 3.2.1 Expressionsvektor für ein Fusionsprotein hABCA3-YFP

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Konstrukte für die Untersuchung des Targetings des Transportproteins ABCA3 in alveolaren Typ II Zellen entwickelt. Als visueller Marker der Proteinlokalisierung dienten hierbei 2 unterschiedliche Varianten grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus *Aequorea victoria*: für das erste Konstrukt wurde ein Fusionsprotein von ABCA3 mit dem gelb-grün fluoreszierenden Protein (YFP) erstellt. Das hABCA3 musste zu diesem Zweck über verschiedene Klonierungsschritte in den Vektor pEYFP-N1 eingebracht werden. Der Vektor codiert für eine verbesserte grün-gelbe Variante von *Aequorea victoria*. EYFP enthält neben mehr als 190 „silent mutations“ zur Angleichung an die menschliche Codon-Präferenz auch eine Kozak Consensus-Sequenz zur Verbesserung der Translationeffizienz vor der EYFP-Sequenz. Zudem trägt der Vektor ein Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion transformierter Bakterien. Zwischen dem CMV-Promoter, welcher die transiente Expression in Säugetierzellen kontrolliert, und der EYFP-kodierenden Sequenz befindet sich die multiple Klonierungsstelle. Für die Klonierung war es zunächst notwendig, die dort vorhandene BglII-Schnittstelle zu entfernen. Dies geschah durch einen Restriktionsverdau mit Eco47III und XhoI, nachdem ein Auffüllen der überhängenden Enden mittels Klenow-Enzym durchgeführt worden war. Anschliessend wurden die Blunt-Ends mithilfe der T4-Ligase religiert. Der Vektor wurde mit EcoRI und ApaI enzymatisch geschnitten und im Anschluss mittels CIP dephosphoryliert. Gleichzeitig wurde das hABCA3 mithilfe eines Restriktionsverdaus mit EcoRI und anschliessender Gelextraktion aus dem Vektor pcDNA3 entfernt. Vor dem Start-Codon lag upstream noch eine etwa 300 bp umfassende nicht-translatierende Region. Danach wurde das Insert mit EcoRI und ApaI geschnitten, und einer Ligation des Inserts in den Zielvektor durchgeführt. Es entstand so ein 10,2 kb grosses Plasmid, welches für die Entfernung des Stopp-Codons am Ende der ABCA3-Sequenz einem erneuten restriktionsenzymatischen Verdau mit BglII und AgeI unterzogen wurde. Im Anschluss wurde das Plasmid mit einem Insert ligiert, welches bei der Amplifikation mit einer Mutation des Stopps im Reverse-Primer versehen worden war. Es entstand so ein Open-Reading-Frame für ein ABCA3-YFP Fusionsprotein mit YFP am C-terminalen Ende der ABCA3-Sequenz.



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung des Vektors pEYFP-N1 mit unterschiedlichen Schnittstellen der Restriktionsenzyme und der multiplen Klonierungsstelle (MCS).



**Abbildung 3.2:** Darstellung der multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Vektors pEYFP-N1. Die schwarzen und roten Pfeile zeigen die in den ersten beiden Arbeitsschritten benutzten Schnittstellen der jeweiligen Restriktionsenzyme.

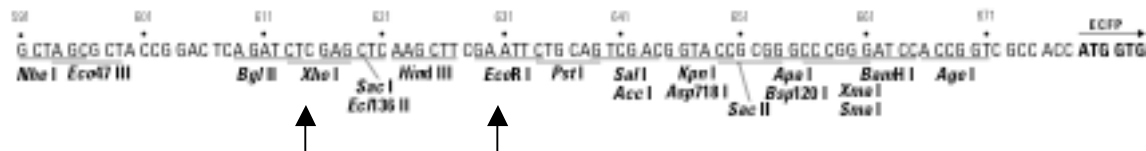
### 3.2.2 Expressionsvektor für ein Fusionsprotein von verkürzten ABCA3-Produkten und YFP

Durch verkürzte ABCA3-Proteinsequenzen wurde die am N-Terminus des Proteins vermutete Targetingsequenz eingegrenzt. Hierfür wurde eine EcoRI-Schnittstelle zur Eliminierung der nicht-translatierenden Region direkt vor das Start-Codon gelegt. Der Reverse-Primer brachte eine Schnittstelle für AgeI an das 3'-Ende der Konstrukte und wurde spezifisch zu unterschiedlichen Sequenzen innerhalb der ersten 478 AS gewählt.

### 3.2.3 Expressionsvektor für ein Fusionsprotein CFP-SPC

Das ABCA3 Protein ist hauptsächlich in der äußeren Membran der Lamellarkörperchen von alveolaren Typ II Zellen lokalisiert. Für die Versuche wurde als Referenzmarker für korrektes Targeting an das Zielorganell ein Fusionsprotein aus CFP und SPC verwendet. SPC ist ebenfalls in diesen lysosomal abgeleiteten Zellorganellen lokalisiert.

Für die Herstellung des Fusionsproteins wurde der Vektor pECFP-C1 zunächst einem enzymatischen Restriktionsverdau mit XhoI und EcoRI unterzogen und in der multiplen Klonierungsstelle geschnitten. Die codierende Sequenz für das SPC, welche 590 bp entspricht, wurde durch eine PCR amplifiziert, für die ein Forward-Primer mit XhoI-Schnittstelle und Mutation des Start Codons eingesetzt wurde. Der Reverse-Primer enthielt das Stopp-Codon. Anschließend erfolgte die Ligation der beiden Produkte.



**Abbildung 3.3:** Darstellung der MCS des Vektors pECFP-C1. Die Pfeile entsprechen den Schnittstellen an denen das SPC in den Expressionsvektor kloniert wurde.

## 3.3 Zellkultur

### 3.3.1 Kultur eukaryotischer Zelllinien

#### Medien:

Name	Herkunft
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom AG (Berlin)
Fetal Bovine Serum	Biochrom AG (Berlin)
Antibiotic-Antimycotic	Gibco (Paisley, UK)
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG (Berlin)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma (Steinheim)
Trypsin/ EDTA x1 0,5 g/l Trypsin	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)

**Tabelle 3.6:** Zellkulturmedien und deren Herkunft.

Nach dem Auftauen der Zellstocks wurden die Zellen in 10 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert und für 2 min bei 270 x g (Rotanta/P) sedimentiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Sediment in 10 ml Medium resuspendiert und die Suspension in Kulturflaschen gegeben. Diese wurden in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> entsprechend der

Pufferkapazität der verwendeten Medien kultiviert. Die Zelllinien wurden nach 2 -3 Tagen zum ersten Mal passagiert. Hierzu wurden die RLE und A549 Zellen nach dem Absaugen des Mediums mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0.05% Trypsin/0.02% EDTA) in PBS überschichtet, für 5 -7 min unter Kulturbedingungen inkubiert und mit 10 ml Medium gewaschen. Die Zellsuspensionen wurden 2 min bei 270 x g und 4 °C zentrifugiert, in Medium resuspendiert und auf neue Kulturflaschen (Nunc, 75 cm<sup>2</sup>) überführt. Je nach Zelllinie wurde alle 48 -72 h ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Zelllinien wurden alle 4-6 Tage im Verhältnis 1 :5 bis 1:10 gesplittet und passagiert.

### 3.3.2 Aussaat und Kultur von A549-Zellen

Die Zellen wurden auf dem Boden einer Zellkulturflasche gehalten und wuchsen dort bis zur Konfluenz. Nach Lösen der Zellen mit Trypsin / EDTA-Lösung wurden die Zellen auf Glasobjektträgern in einer „Six-well“ Zellkulturschale verteilt. Je nach Transfektionsart wurde weiter nach den folgenden Protokollen verfahren.

### 3.3.3 Transiente Zelltransfektion

Die beiden Zelllinien RLE und A549 wurden mit verschiedenen rekombinanten Plasmiden transfiziert, um das lysosomale Targeting des Proteins ABCA3 zu untersuchen. Im Gegensatz zur stabilen Transfektion wird bei der transienten Transfektion die Plasmid DNA nur vorübergehend in die Wirtszelle eingebracht. Dazu muss die für Makromoleküle normalerweise impermeable Zellmembran der eukaryotischen Zelle überwunden werden. Zwei unterschiedliche Methoden kamen dafür zur Anwendung: Die Lipofektion und die Magnetofektion.

### Lipofektion von A549-Zellen und RLE-Zellen

Stamm	Zellart	Herkunft
A549	Humane Lungenkarzinomzellen	ATCC, USA
RLE-6TN	Ratten Lungenepithelzellen	ATCC, USA

Tabelle 3.7: Die für die Transfektion genutzten Zelllinien und deren Herkunft.

Bei dieser Methode wird das Plasmid mit Hilfe von Liposomen in die Zielzelle eingebracht. Diese Strukturen fusionieren mit Zellmembranen und schütten ihren Inhalt in das Zellinnere aus. Folgendes Protokoll kam zur Anwendung:

1. In Six-Well-Platten werden etwa 200.000 Zellen pro Well in 2 ml DMEM (mit 10% FBS und nicht-essentiellen Aminosäuren) ausgesät.
2. Die Zellen wachsen bei 37°C im CO<sub>2</sub> Inkubator, bis die Zellen zu 70-80% konfluent sind.



3. Folgende Lösungen werden steril zubereitet:  
 A: 2  $\mu\text{g}$  DNA gelöst in 100  $\mu\text{l}$  Serum-freien DMEM  
 B: 5  $\mu\text{l}$  Lipofectamine in 100  $\mu\text{l}$  Serum-freien DMEM
4. Die beiden Lösungen werden vorsichtig vereinigt, gemischt und 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Zellen werden einmal mit 2 ml Serum-freien DMEM gewaschen.
6. Pro Well werden 0,5 ml DMEM mit 200  $\mu\text{l}$  Transfektionslösung auf die gewachsenen Zellen geschichtet.
7. Die Zellen werden 5 Stunden lang bei 37°C inkubiert.
8. Ohne Entfernung der Transfektionslösung wird 1 ml DMEM mit 20 % FBS zugegeben.
9. 18-24 h nach Beginn der Transfektion wird das Medium gewechselt.
10. 24-72 h nach Beginn der Transfektion können die Zellextrakte auf Genaktivität getestet werden.

### **Magnetofektion von A549-Zellen**

Die Magnetofektion ist eine Methode, welcher eine Assoziation von DNA mit Eisenoxidpartikeln zugrunde liegt, wobei diese mit kationischen Molekülen beschichtet sind.

Dabei werden adhärente Zellen in Kultur mithilfe des nichtviralen Transfektionsvektors PEI (Polyethylenimin) und den daran gekoppelten Eisenoxidpartikeln unter Einfluss eines starken Stabmagneten in die Zielzelle transfiziert. Die Magneten werden an der Unterseite der Kulturivierungsschale angebracht. Dabei wird folgendermaßen vorgegangen:

1. Die Deckgläser werden mit 70 % Ethanol desinfiziert, in eine 12-Well-Platte überführt und zweimal mit PBS gewaschen.
2. Etwa 20.000 Zellen werden pro Well ausgesät und mit 2 ml Kulturmedium im CO<sub>2</sub> Inkubator bis 60% Konfluenz inkubiert.
3. Folgende Lösungen werden steril vorbereitet:  
 A: 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA gelöst in 50  $\mu\text{l}$  Serum-freien DMEM  
 B: 1  $\mu\text{l}$  PolyMAG BL 16/1 gelöst in 50  $\mu\text{l}$  Serum-freien DMEM
4. Die beiden Lösungen werden vorsichtig vereinigt und für 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen.
6. Die Zellen werden mit dem Transfektionsgemisch überschichtet.
7. Die Kulturplatte wird auf den Magneten gestellt und im Kulturschrank 15 Minuten lang inkubiert.
8. Das Transfektionsgemisch wird abgesaugt, die Zellen werden mit Kulturmedium inklusive Serum und Antibiotikum versorgt.

9. Nach frühestens 24 Stunden werden die Zellen auf Expression des eingebrachten Plasmids überprüft.

### 3.3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Materialien	Herkunft
3% Formalin in PBS	Sigma, Steinheim
1% TritonX-100 in PBS	Sigma, Steinheim

Für den Nachweis der korrekten Expression der rekombinanten Plasmide wurde ein primärer Antikörper verwendet, der spezifisch ein im gleichen Zellorganell lokalisiertes Protein bindet.

Dieser primäre Antikörper wurde durch Bindung an einen sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Dazu wurde der Fluoreszenzfarbstoff des sekundären Antikörpers mit Licht spezifischer Wellenlänge angeregt. Der Farbstoff emittiert daraufhin in einem spezifischen, nicht überlappenden Emissionsspektrum

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

#### Primäre Antikörper

Name	Eigenschaft	Herkunft
Kaninchen Anti-Schaf Surfactant Protein B (SPB)	polyklonal	Chemicon (USA)
Maus Anti-Menschliches Kollagen Typ V (3C9)	monoklonal	Chemicon (USA)

**Tabelle 3.8:** Primäre Antikörper

#### Sekundäre Antikörper

Name	Eigenschaft	Herkunft
Sheep anti-Mouse Ig, (H+L) Rhodamine Conjugated Affinity Purified F(ab') <sub>2</sub>	polyklonal	Chemicon (USA)

**Tabelle 3.9:** Sekundäre Antikörper.

Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

1. Die transfizierten Zellen werden 48h nach Beginn der Transfektion zweimal mit PBS (je well 2,5ml) gewaschen.

2. Danach werden die Zellen in Formalinlösung (1ml/well) für 30 Minuten fixiert und daraufhin erneut mit PBS gewaschen.
3. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wird 1% Triton X-100/PBS (1ml/well) für 5 Minuten zugegeben. Dabei wird die Struktur von Doppelschichten derart verändert, dass der primäre Antikörper in die Zelle eindringen kann. Nach der Permeabilisierung werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.
4. Als primärer Antikörper für die Konstrukte wurde ein Antikörper gegen SPB verwendet. Für die verkürzten YFP-Fusionsproteine wurde keine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierfür wurde als Marker das SPC-CFP Fusionsprotein benutzt. Die primären Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:100 in PBS eingesetzt. Dazu wurde auf einen Streifen Parafilm 50  $\mu$ l Antikörperlösung aufgetropft, Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf diesen Tropfen gelegt und bei Dunkelheit 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Gläschen mit der bewachsenen Seite nach oben wieder in das 6Six-Well überführt.
5. Nicht gebundene primäre Antikörper wurde aus den Zellen durch 10maliges waschen mit 2,5ml PBS pro Well entfernt.
6. Die Verdünnung für den sekundären Antikörper lag bei 1:50 in PBS, wobei die Deckgläschen in gleicher Weise wie bei dem ersten Inkubationsschritt für 60 min inkubiert wurden.
7. Der nicht gebundene sekundäre Antikörper wurde wiederum in 10 Waschschritten mit jeweils 2,5ml PBS pro Well abgewaschen.
8. Die Zellen wurden danach auf Objektgläsern in 5  $\mu$ l eines anti-fading Reagenz (Vectashield; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) eingebettet und mit Nagellack versiegelt.

### 3.3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die mit YFP und CFP transfizierten und teilweise mit Rhodamin markierten Zellen wurden mit einem Zeiss Axiovert 135 invertierten Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen) mit entsprechenden Fluoreszenzfiltern untersucht. Dies waren im Einzelnen:

Plasmid	Exzitationsmaximum (nm)	Emissionswellenlänge (nm)	Extinktionskoeffizient (cm $-1$ M $-1$ )
ECFP	434	477	26000
EYFP	500	527	84000
Rhodamin	550	570	25000

**Tabelle 3.10:** Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Fluoreszenzproteine.

Zur Aufzeichnung der Bilder wurde eine Digitalkamera der Firma Zeiss mit der zugehörigen Software Axiovision benutzt.

### 3.4 Proteinbiochemische Methoden

MSH Puffer (pH 7,4):	210 mM Mannitol (ICN Biomedical, Aurora, USA) 70 mM Sucrose (Sigma, Steinheim) 5 mM Hepes (Sigma, Steinheim) 1 Tabl. Proteinase Inhibitor/ l (Roche, Mannheim)
Laufpuffer 1:	50 ml NuPage MOPS SDS Running Buffer 20x (Invitrogen, Karlsruhe), ad 1 l Aqua bidest.
Laufpuffer 2:	50 ml NuPage MOPS SDS Running Buffer 20x 500 µl Antioxidant Agent (Invitrogen, Karlsruhe), ad 1 l Aqua bidest.

#### 3.4.1 Homogenisation von Zellen

Die transfizierten und vorkultivierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Gummischaber vom Boden der Kulturschale gelöst und in 1 ml PBS resuspendiert. Pro Kultur wurden eine Kulturschale (21,9 cm<sup>2</sup>) eingesetzt. Danach wurden die Zellen bei 300 g und 37°C für 15 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl eiskaltem MSH-Puffer aufgenommen.

Danach wurde die Suspension 5 Minuten lang bei 600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Auftrennung verwendet.

#### 3.4.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Vor der immunchemischen Detektion im Western Blot wurden die Proteinfractionen über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt.

Folgender Ansatz wurde verwendet:

13 $\mu$ l	Zellsuspension
5 $\mu$ l	4 x NuPage LDS Sample Puffer (Invitrogen, Karlsruhe)
2 $\mu$ l	10 x Nupage Reducing Agent (Invitrogen, Karlsruhe)
20 $\mu$ l	Gesamtvolumen

Die Proben wurden für 10 min bei 70 °C im Heizblock denaturiert, 30 Sekunden lang auf Eis gekühlt und in die Geltaschen eines NuPage Bis Tris Gel (Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Marker diente der See Blue Marker von Invitrogen, Karlsruhe. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke zwischen 60 und 120 mA pro Gel durchgeführt.

### 3.5.3 Western Blot

TBS-Puffer (pH 7,5):	20mM Tris (Sigma, Steinheim) 140mM NaCl (Merck, Darmstadt)
Blockpuffer:	5 g Milchpulver (Merck, Darmstadt) ad 100 ml TBS
Transferpuffer:	50 ml NuPage Transferbuffer 20 x (Invitrogen, Karlsruhe) 100 ml Methanol (Merck, Darmstadt)
Inkubationspuffer:	5 g Milchpulver ad 100 ml TBS
Waschpuffer:	5 ml Tween 20 (Sigma, Steinheim) ad 1 l TBS
Detektionspuffer (pH 9,5):	0,1 M Tris Hcl , 0,1 M NaCl

Antikörper	Herkunft
Anti-XFP-polyklonaler Maus AK 1 mg/ml	BD Clontech, San Diego, USA
Anti-Maus-IgG alk. Phosphatase 1 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe

**Tabelle 3.11:** Antikörper für den Western Blot.

1. Nach der SDS Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine einer Transferkassette aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Optitrans BA-S 85, Schleicher und Schuell, BioScience, Dassel) überführt.
2. Dazu wurden das Gel und die Nitrocellulosemembran in eine Western Blotting Apparatur gespannt, welche mit Transferpuffer befüllt worden war. Der Transfer wurde bei einer konstanten Spannung von 30 Volt durchgeführt.
3. Für die anschließende Immundetektion der Proteine wurde die Membran zunächst dreimal für jeweils fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen.
4. Danach wurde übernacht bei 4 °C mit einem Milchpulver-haltigen Blockpuffer inkubiert, um die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen.
5. Nach erneutem Waschen mit Waschpuffer wurde der primäre Antikörper gegen YFP (Anti-XFP) in einer Verdünnung 1:2000 in Inkubationspuffer aufgetragen und für eine Stunde inkubiert.
6. Im Anschluss wurde die Membran nach einem weiteren Waschschrift mit dem sekundären Antikörper ( Anti-Maus-IgG Alkalische Phosphatase) in einer Verdünnung von 1:10000 in Inkubationspuffer wiederum für eine Stunde inkubiert.
7. Nach einem erneuten Waschschrift wurde die Membran für 5 Minuten zur Alkalisierung mit Detektionspuffer gewaschen. Das Reagenz CDP-Star (Roche, Mannheim) wurde in einer Verdünnung 1:100 in TBS auf die Membranen getropft und 5 Minuten lang inkubiert. Als Produkt der Reaktion mit CDP-Star tritt eine Lichtemission bei 466 nm auf. Die Membran wird in einer lichtgeschützten Kassette auf einen Röntgenfilm (Typon Medical Systems AG, Burgdorf, CH) aufgelegt und für eine Stunde belichtet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Vorgehen

Für die Charakterisierung der Targetingsequenz des ABCA3-Proteins wurden verschiedene Konstrukte aus der cDNA von ABCA3 entwickelt, in einem geeigneten Zellkultursystem zur Expression gebracht und auf die subzelluläre Lokalisation hin untersucht.

Als Grundlage dieser Konstrukte dienten Computergestützte Vergleiche mit anderen ABCA-Proteinen und Programme zur Vorhersage der Sekundärstruktur von ABCA3.

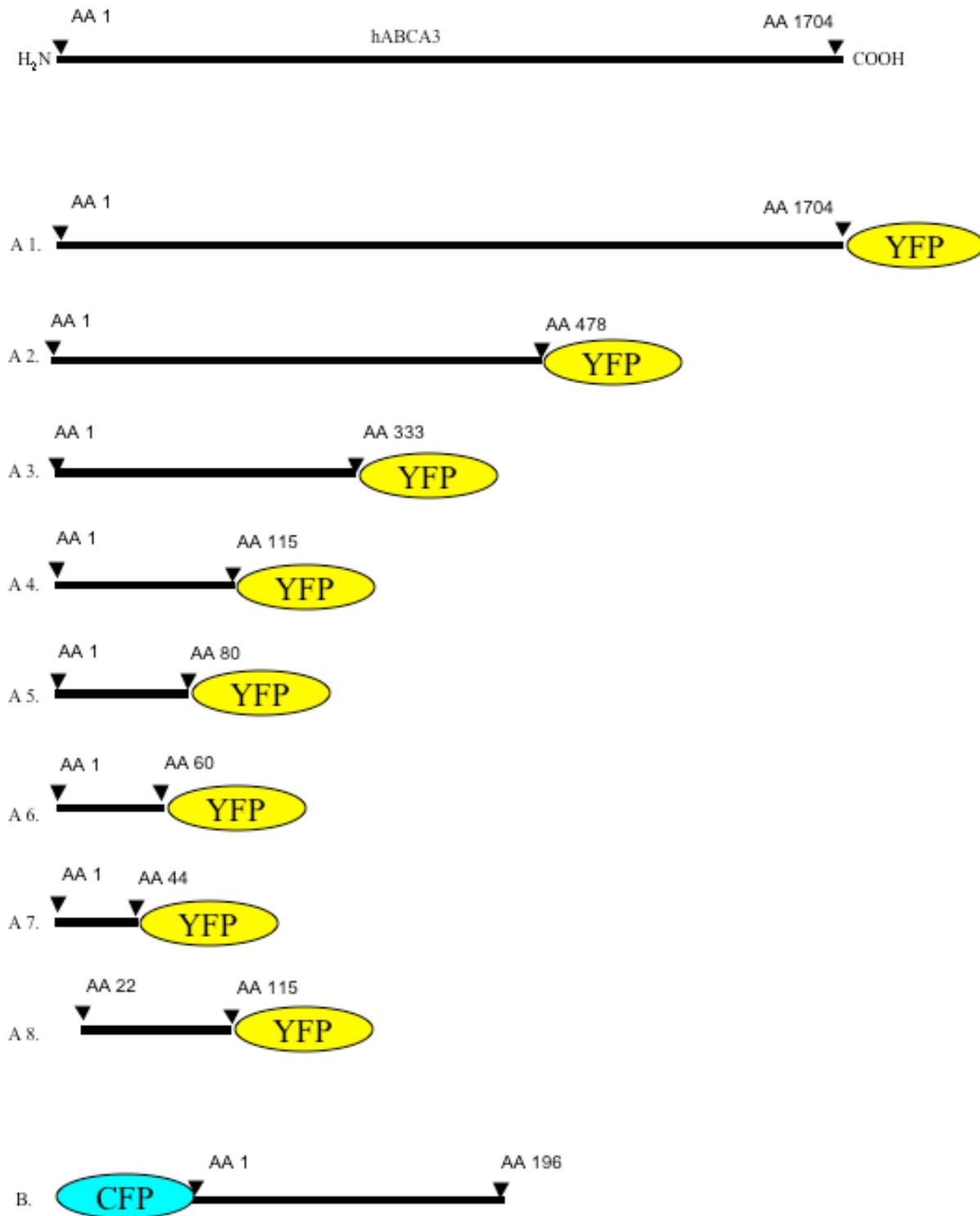
Als erstes Konstrukt wurde ABCA3cDNA voller Länge in verschiedenen Schritten in den Vektor EYFP-N1 kloniert. Gleichzeitig entwickelten wir ein Konstrukt bei welchen wir das Surfactant-Protein C-cDNA in einen ECFP-C1-Vektor klonierten. Beide Proteine, welche im gleichen Zellorganell lokalisiert sind, wurden in einem Zellkultursystem mit menschlichen alveolären Typ II-Zellen zur Expression gebracht und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Hierbei musste auch geklärt werden ob die angehängten fluoreszierenden Proteine das Targeting des ABC-Transporters beeinflussen können. Daher führten wir im Anschluss an die Kotransfektion eine Gegenfärbung mit einem primären Antikörper gegen Surfactant-Protein-B durch, welches ebenfalls im Zielorganell lokalisiert ist.

Zum Ausschluss eines spezifischen Verteilungsmusters nach Transfektion in die alveolären Typ-II-Lungenzellen brachten wir YFP alleine in A549-Zellkultursystem zur Expression.

Danach wurden Fusionsproteine aus aminoterminalen Abschnitten des ABCA3-Transporters entwickelt und wiederum nach Kotransfektion mit dem Fusionsprotein aus CFP-SPC in A549-Zellen untersucht. Zum Nachweis der verkürzten Konstrukte im Zellkultursystem wurden schließlich die kürzesten Fusionsproteine aus ABCA3 und YFP in einem Western Blot dargestellt.

Zuletzt wurde die so eingegrenzte Targetingsequenz des ABCA3-Proteins theoretisch in den Zusammenhang mit lysosomalen Targetingmotiven gestellt und hierbei Bezug auf mögliche Verteilungsstörungen genommen.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung des hABCA3 und der entwickelten Expressionskonstrukte (A1-8) für die Bestimmung der Targetingsequenz des Transporters. (B): Schematische Darstellung des CFP-SPC-Fusionsproteins.



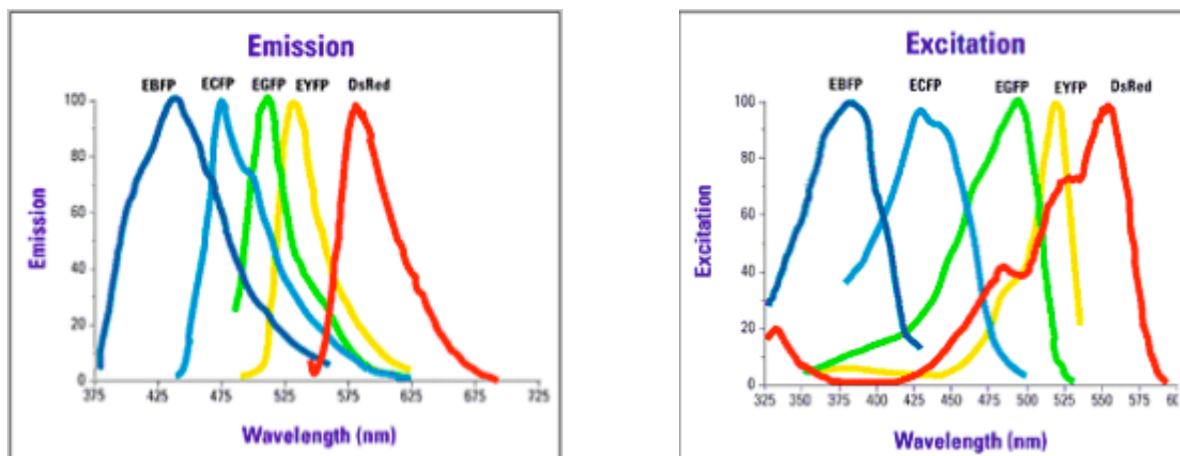
## 4.2 Fluoreszierende Proteine

Für den subzellulären Nachweis der Proteine wurden Fusionskonstrukte mit fluoreszierenden Proteinen genutzt. In dieser Arbeit wurden die beiden Gene *yfp* und *cfp* verwendet. Diese Gene kodieren für Proteine mit Fluoreszenzaktivität und können nach Expression in einem Zellkultursystem direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop in der Zelle nachgewiesen werden.

Die Proteine YFP und CFP sind Varianten des ursprünglich genutzten grün-fluoreszierenden Proteins (GFP). Das 27 kDa grosse Protein wurde bereits 1962 aus der biolumineszenten Tiefseequalle *Aequorea victoria* isoliert und wird seit 1994 für eine Methode genutzt bei der es möglich ist eine C- oder N-terminale Fusion des fluoreszierenden Proteins mit einem beliebigen anderen Protein herbeizuführen (Chalfie 1994). In diesem Fall wurden die fluoreszierenden Proteine mit SP-C, ABCA3 und mit den verkürzten ABCA3-Teilstücken fusioniert.

Nach Expression in einem Zellkultursystem können anhand des Verteilungsmusters Rückschlüsse auf die Lokalisation des untersuchten Proteins gezogen werden.

Die Fluoreszenz ist sowohl im konventionellen Epifluoreszenzmikroskop als auch im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop gut detektierbar. Die beiden Fluoreszenzproteine wurden ausgewählt, da YFP und CFP sich vom Fluoreszenzspektrum her deutlich unterscheiden (s. Abbildung) und somit simultan detektiert werden können.



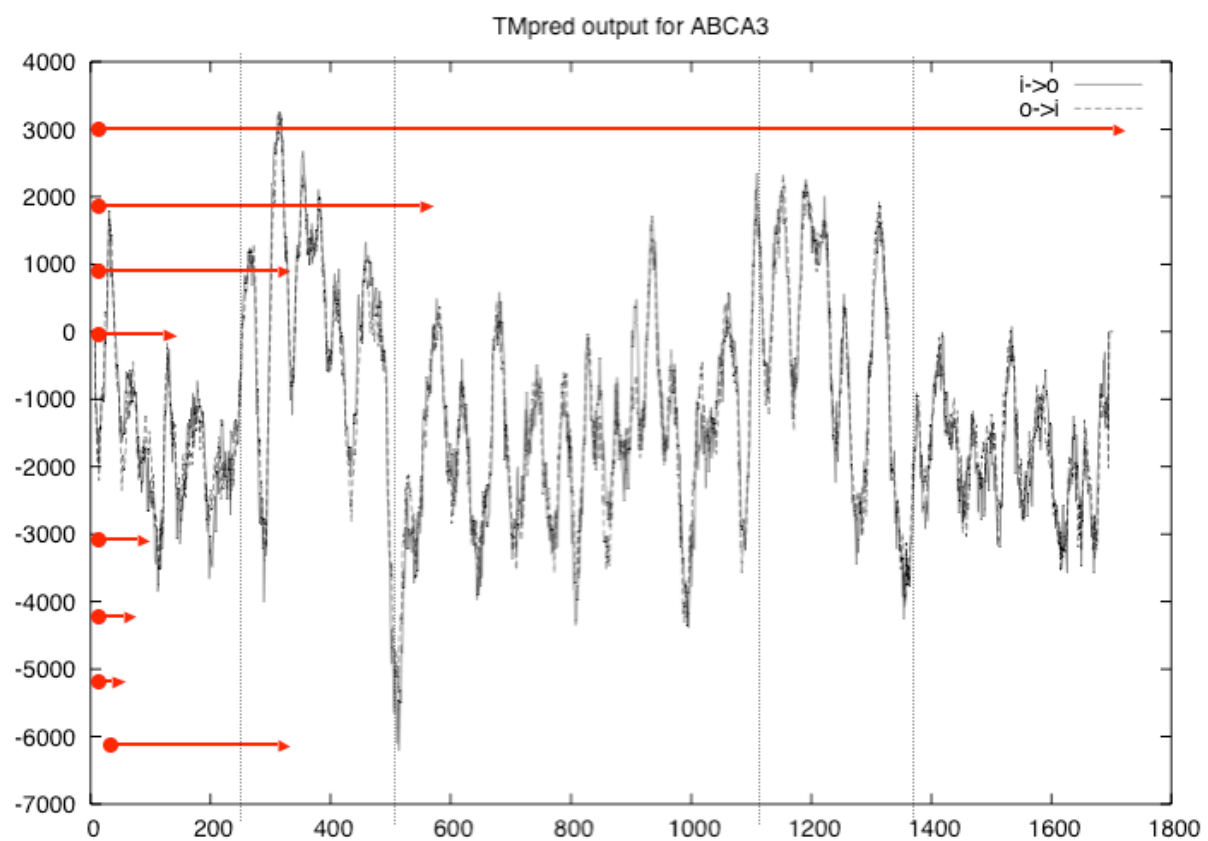
**Abbildung 4.2:** Emissions – und Exzitationsspektren der verschiedenen Fluoreszenz-Proteine. Die Darstellung zeigt die deutliche Trennung der Spektren von EYFP und ECFP.

### 4.3 In siliko Methoden zur Berechnung der Sekundärstruktur von ABCA3

Die Sekundärstruktur von ABCA3 ist bisher nicht eindeutig beschrieben worden. Für die Planung der Konstrukte war es zunächst notwendig mithilfe eines Computer-Programmes eine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit von Transmembrandomänen zu machen. Als Grundlage hierfür gilt die Methode zur Analyse der Hydrophathie nach Kyte und Doolittle (Kyte J 1982). Bei dem von uns genutzten Programm handelt es sich um Tmpred (Hofmann K 1993).

Das erste Fusionskonstrukt aus ABCA3 und YFP, welches das gesamte Protein umfasst, beinhaltet beide Transmembrandomänen des ABCA3-Proteins. Die weiteren Konstrukte wurden dann entsprechend im Verhältnis zur ersten Transmembrandomäne gewählt.

Basierend auf der Grundstruktur der ABC-Proteine befindet sich die ATP-bindene Domäne zwischen der ersten und zweiten bzw. C-terminal der zweiten Transmembrandomäne.



**Abbildung 4.3:** Graphische Darstellung der Computer-gestützten Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit von Transmembrandomänen (Programme Tmpred). Die Konstrukte sind hierbei als rote Pfeile mit eingefügt. Die gestrichelten Linien grenzen den Bereich der Transmembrandomäne ein.

Von den lysosomalen Targetingsignalen ist bekannt, dass sie auf Aminosäuresequenzebene nicht genau konserviert sind. Wir führten einen direkten Vergleich der Aminosäuresequenz von verschiedenen ABCA-Proteinen durch um eine Aussage über den Konservierungsgrad am N-Terminus zu erhalten.

Hierbei zeigte sich im Vergleich der ersten 60 Aminosäuren eine mäßige Übereinstimmung in der Primärstruktur der Proteine. Das ABCD1-Protein (ALD) zeigt keinen dem ABCA3 vergleichbaren N-Terminus.

ABCA1	1	MACWPQRLRLLLWKNLTERRRQTCQLILEVAWPIEFIFLILISVRLSYPPYEQHECHPNKA
ABCA3	1	MAVLRQIALLLWKNYTLQKRKVLVTVLEIFLPILFSGILIWRLKIQSENVNATIYPGQ
ABCA4	1	MGFVRQIQLLWKNWTLRKQKIRFVVELVWPLSIFLVLIWLRNANPLYSHHECHPNKA
ABCA12	1	MASLFHQQLILVWKNWLGVKRQPLWTLVLILWPVLIIFILATRTKFPPTAKPTCYLAPR
ABCD1	1	MPVLSRPRPWGNTLKRATAVLLALAAAYGAHKVYPLVRQCLAPARGLQAPAGEPTQEASGV

**Abbildung 4.4:** Die ersten sechzig N-terminalen Aminosäuren der ABCA-Proteine 1,3,4 und 12 im Vergleich. Zusätzlich dargestellt ist die Sequenz des ALD-Proteins (ABCD1). Schwarz gekennzeichnet sind gleiche Aminosäuren. Grau dargestellt sind die AS mit ähnlichen chemischen Eigenschaften. Bei allen fünf Proteinen handelt es sich um menschliche Proteine.

## 4.4 Kolokalisationsstudien zur Untersuchung des Targetingsignals des humanen ABCA3-Transporters

### 4.4.1 ABCA3 besitzt ein aminoterminales Targetingsignal

Aufgrund unterschiedlicher Überlegungen waren wir zunächst von einer aminoterminalen Lokalisation der Targetingsequenz des ABCA3-Proteins ausgegangen:

Bei Untersuchungen der (peroxisomalen) Targetingsequenz eines anderen ABC-Proteins, dem Adrenoleukodystrophie-Protein (ALD-Protein=ABCD1) in unserer Arbeitsgruppe hatte sich eine Lokalisation des Targetingmotives in diesem Fall zwischen Aminosäure 67-110 gezeigt. Das ABC-Protein der Subgruppe D1 ist defekt oder fehlend bei der Adrenoleukodystrophie. Zudem befinden sich die meisten der zurzeit bekannten endosomalen-lysosomalen Targetingsignale in der zytosolischen Domäne der Transmembranproteine dieser Strukturen (Bonifacino J. S. 2003).

Ausgehend von dieser Annahme wurden nun Konstrukte im Bereich der vermuteten Signalsequenz entwickelt und sukzessive verkürzt.

#### 4.4.2 Natives YFP in A549-Zellen ist zytoplasmisch lokalisiert

Für die folgenden Untersuchungen war es notwendig natives YFP und CFP in das benutzte Zellsystem zu transfizieren um die nicht-spezifische Anreicherung in den A549-Zellen zu demonstrieren. Bei diesem Zelltyp handelt es sich um alveolaren Typ II Zellen ähnliche humane Adenokarzinomzellen.

Diese beinhalten subzelluläre Strukturen, welche Lamellarkörperchen entsprechen. Die Proteine SP-B und SP-C definieren dabei in unseren Versuchen dieses Zellorganell. Wie in anderen Vorarbeiten im gleichen Zellkultursystem bereits gezeigt (Mulugeta S 2003), kommt es hierbei zu einem unspezifischen zytoplasmatischen Verteilungsmuster in den Zellen, welches dem entsprechend nicht mit dem lysosomalen Muster des SPC-CFP Fusionsproteins zur Deckung kommt.

#### 4.4.3 Kolokalisationsversuche zur Darstellung der zellulären Sublokalisierung

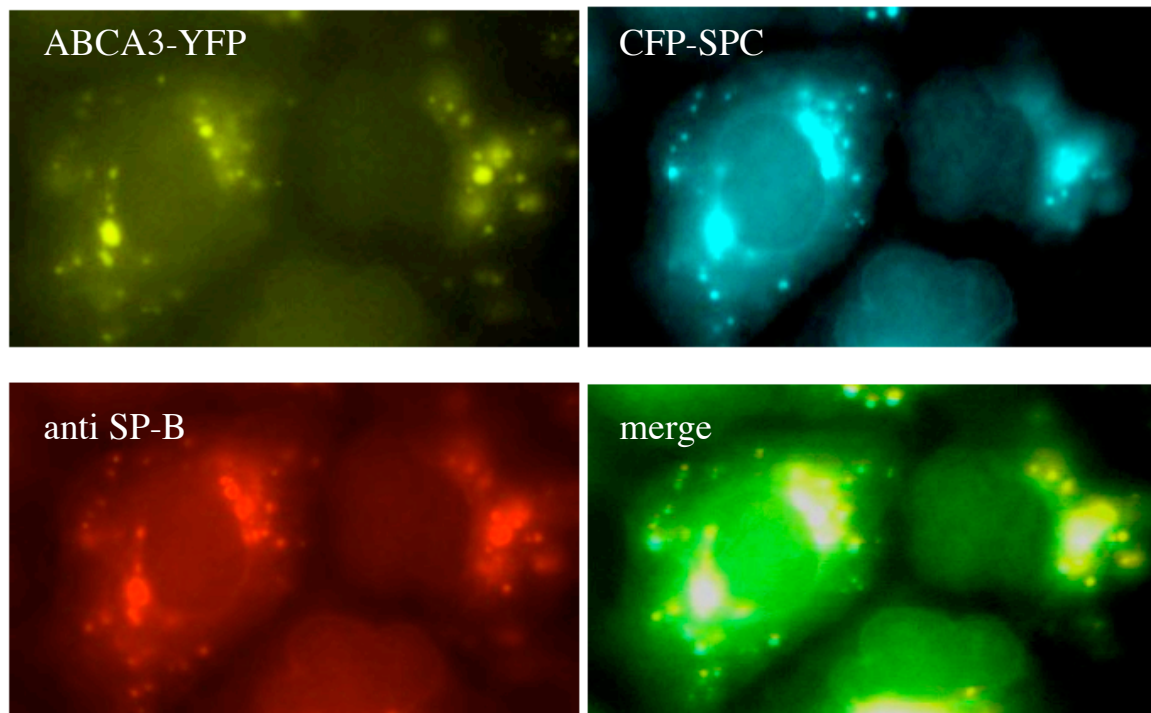
Bei den ersten Experimenten, welche letztendlich zur Identifikation des ABCA3-Transporters geführt hatten, wurden Fusionsproteine aus humanen Vollängen-ABCA3 und Expressionsvektoren genutzt (Mulugeta S. 2002, Yamano G. 2001). Ausgehend von diesen Versuchen entwickelten wir ein Fusionsprotein aus ABCA3 mit einem gelb fluoreszierenden Protein (YFP). Nach Transfektion des Vektors in humane Alveolar Typ II-Zellen zeigte sich ein typisches, in diesem Fall im Fluoreszenzmikroskop gelb leuchtendes, lysosomales Verteilungsmuster mit Aussparung des Zellkernes, welches vergleichbar mit den Ergebnissen aus den Vorarbeiten war.

Die Kotransfektion mit dem für die folgenden Versuche als Marker genutzten Fusionsprotein aus SPC und cyan-fluoreszierenden Protein (CFP) erbrachte eine Deckungsgleichheit beider Punktmuster, als Nachweis einer lysosomalen Lokalisation.

Als weiterer Beweis einer korrekten Darstellung der Lamellarkörperchen wurde nach der Kotransfektion der beiden Konstrukte eine Gegenfärbung mit einem Antikörper gegen SP-B durchgeführt. In diesem Fall zeigt sich eine Deckungsgleichheit mit dem Punktmuster der kotransfizierten Konstrukte.

Konstrukt	Fluoreszenzmarker	Lokalisation
ABCA3-YFP	Gelb	Lamellarkörperchen
CFP-SPC	Cyan	Lamellarkörperchen

**Tabelle 4.1:** Beide Fusionskonstrukte mit der entsprechenden subzellulären Lokalisation



**Abbildung 4.5 :** Lysosomale Signale von ABCA3, SP-C, SP-B. Das Volllängenprodukt von ABCA3 und YFP zeigt ein übereinstimmendes Punktmuster im Vergleich mit CFP-SPC. Die Gegenfärbung mit einem Antikörper gegen SP-B zeigt eine eindeutige Lokalisation im Lamellarkörperchen. In 4 sind die übereinander gelegten Bilder dargestellt.

#### 4.4.4 Kolokalisationsversuche zum Nachweis des Signalpeptids

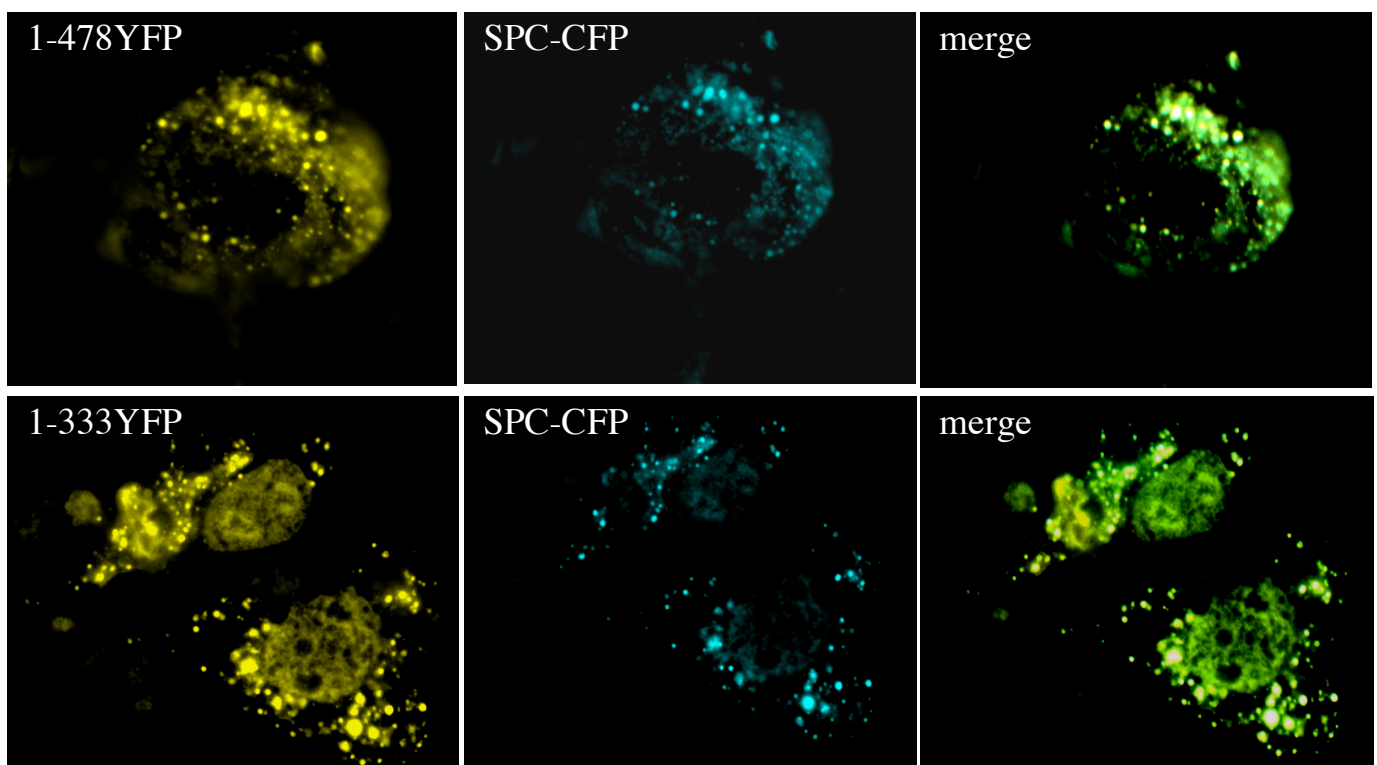
##### 4.4.4.1 Das Targetingsignal liegt innerhalb der ersten 115 AS

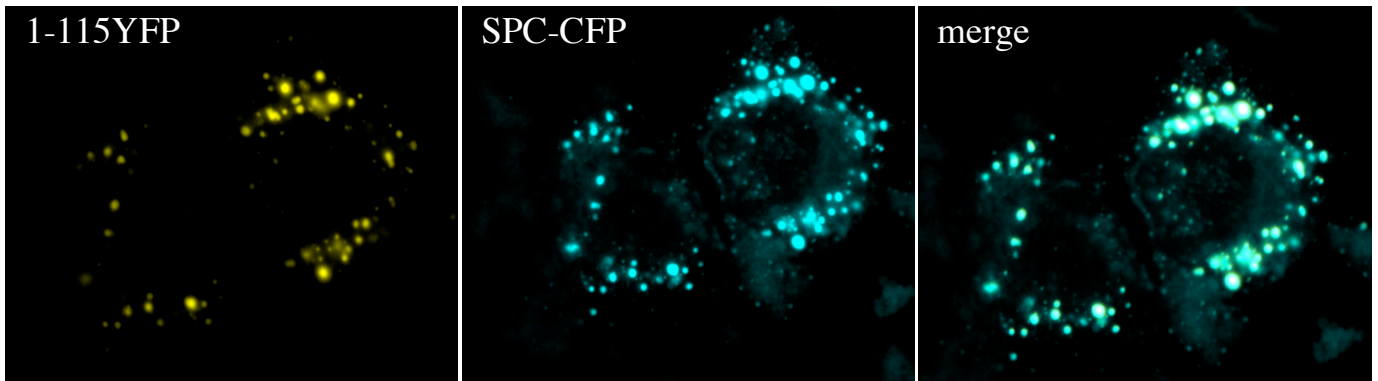
Um das N-terminal vermutete Targetingsignal des ABCA3-Proteins eingrenzen zu können wurde in einem ersten Schritt ein Fusionsprotein mit den ersten 478 AS des Proteins und YFP konstruiert.

Sowohl die vom N-Terminus gesehenen ersten 478 AS, als auch die ersten 333 AS sind hierbei ausreichend um ein lysosomales Targeting zu gewährleisten. Auch eine Reduktion auf 115 Aminosäuren zeigt eine Übereinstimmung im Verteilungsmuster. Alle drei Konstrukte zeigen ein typisches lysosomales Verteilungsmuster und Deckungsgleichheit mit dem Markerprotein SPC-CFP.

Konstruktnamen	Kloniert mit Restriktionsenzym 5'/3'	Aminosäurelänge des kodierten Proteins	Transfizierter Zelltyp	Kolokalisation
ABCA3-YFP	Eco 47 III/ Xho I Eco R I/ Apa I Bgl II/ Age I	1704	A549/ RLE-6TN	Positiv
1-478 ABCA3-YFP	Eco R I/ Age I	478	A549	Positiv
1-333 ABCA3-YFP	Eco R I/ Age I	333	A549	Positiv
1-115 ABCA3-YFP	Eco R I/ Age I	115	A549	Positiv

**Tabelle 4.2:** Die ersten drei verkürzten Konstrukte und deren Kolokalisation in der Zelle.





**Abbildung 4.6:** Darstellung des lamellaren Targetings der jeweils 1704, 133 und 115 Aminosäuren umfassenden Konstrukte. 1-1704 ABCA3-YFP zeigt ein übereinstimmendes Bild mit dem Konstrukt CFP-SPC. Auch 1-133 ABCA3-YFP und 1-115 ABCA3 zeigen ein gleiches Verteilungsmuster in der Fluoreszenzmikroskopie.

#### 4.4.4.2 Das Targetingsignal liegt innerhalb der ersten 44 AS

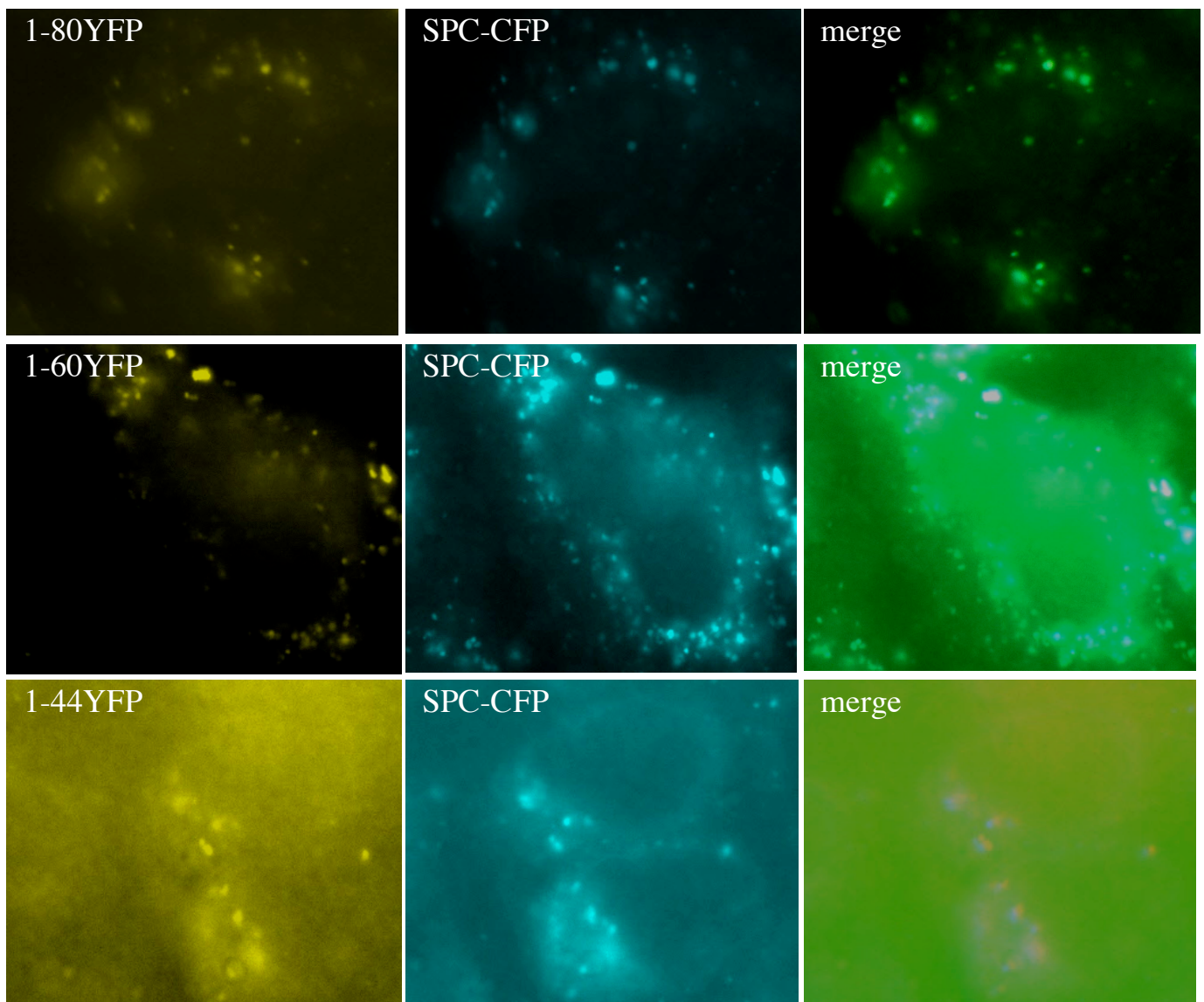
Für eine weitere Eingrenzung der Signalsequenz wurde nun in Bezug auf die Sekundärstruktur des Proteins eine sukzessive Verkürzung am aminoterminalen Ende des ABCA3-Proteins durchgeführt.

Hierbei zeigten sowohl die ersten 115 AS als auch die ersten 80 AS ein korrektes Targeting an das Lamellarkörperchen. Die Verkürzung auf 60 AS und 44 AS erbrachte ebenfalls ein mit dem Marker SPC-CFP übereinstimmendes Bild nach Transfektion in A549-Zellen.

Konstruktnamen	Kloniert mit Restriktionsenzym 5' / 3'	Aminosäurelänge des kodierten Proteins	Transfizierter Zelltyp	Kolokalisation
1-80 ABCA3-YFP	Eco R I/ Age I	80	A549	Positiv
1-60 ABCA3-YFP	Eco R I/ Age I	60	A549	Positiv
1-44 ABCA3-YFP	Eco R I/ Age I	44	A549	Positiv
22-115 ABCA3-YFP	Eco R I/ Age I	92	A549	Positiv

**Tabelle 4.3:** Weitere verkürzte Konstrukte und deren Kolokalisation.





**Abbildung 4.7:** Darstellung der weiter verkürzten Konstrukte, welche noch für ein Targeting an das Lamellarkörperchen ausreichend sind. Auch bei den Konstrukten 1-44 ABCA3-YFP, 1-60 ABCA3-YFP und 1-80 ABCA3-YFP ist eine deutliche Kolokalisation mit dem lamellaren Marker CFP-SPC deutlich zu erkennen.

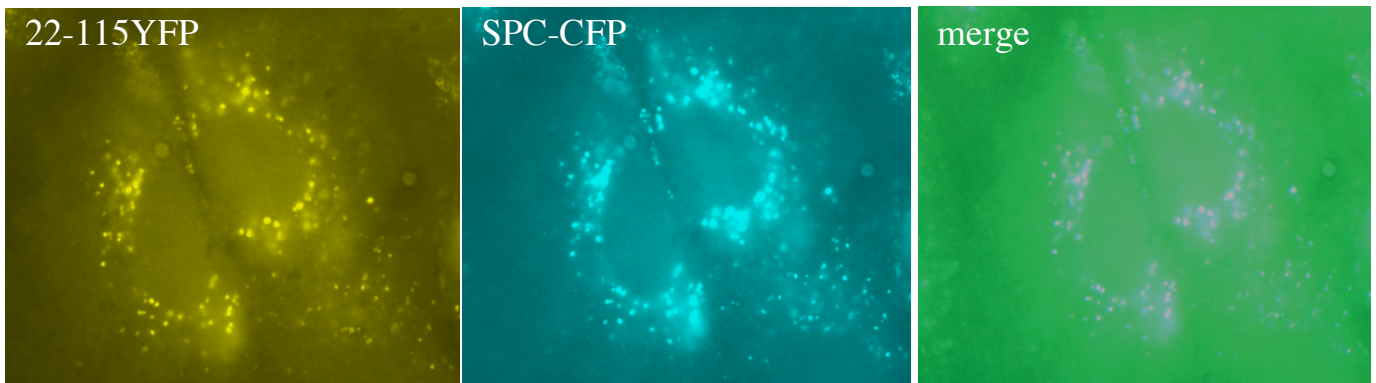
#### 4.4.4.3 Das Targetingsignal liegt zwischen den AS 22 und 44

Um das Signalpeptid weiter eingrenzen zu können wurde nun ein Konstrukt entwickelt, dem die in den Vorversuchen vorhandenen N-terminalen Abschnitte fehlten.

Das Konstrukt, welches die Aminosäuren 22-115 umspannt, zeigte in den Kolokalisationsversuchen eine klare lysosomale Verteilung mit Deckungsgleichheit mit dem Markerprotein.



Da sowohl das Konstrukt von Aminosäure 1-44, als auch das Konstrukt 22-115 eine Übereinstimmung im Verteilungsmuster mit CFP-SPC zeigt, spricht dies im Rückschluss für eine Targetingsequenz zwischen Aminosäure 22 und 44. Dies entspricht der folgenden Aminosäuresequenz VLVTVLELFLPLLFSGILIWLRL des ABCA3-Transporters.



**Abbildung 4.8:** Auch das Konstrukt mit fehlenden Aminoterminus 22-115 ABCA3-YFP zeigt ein Targeting zum Lamellarkörperchen. CFP-SPC ist in der gleichen Zelle exprimiert worden und zeigt ein deckungsgleiches Bild mit dem Marker-Protein.

#### 4.5 Proteinbiochemische Analyse der Fusionskonstrukte

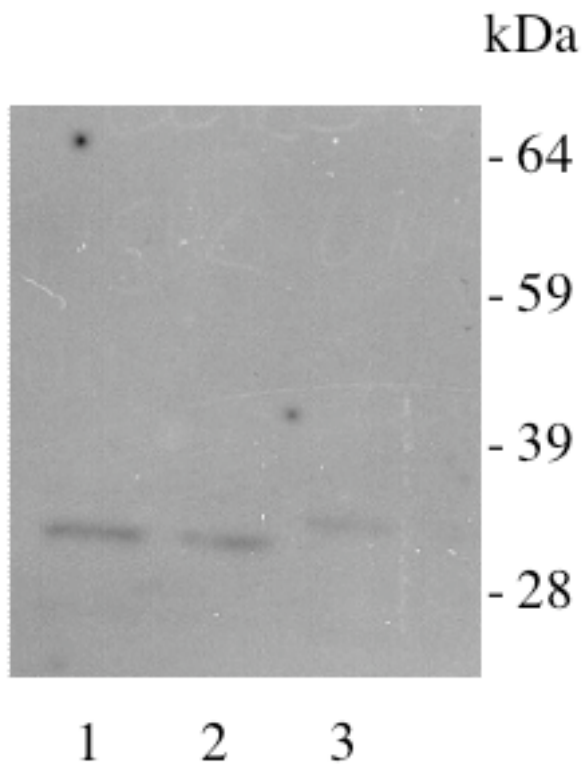
Für den quantitativen Nachweis der Fusionsproteine im Zellkultursystem wurde eine Darstellung im Western Blot gewählt.

Zu diesem Zweck wurden A549-Zellen mit den Fusionsproteinen aus verkürzten ABCA3 und YFP transfiziert. Diese beinhalteten die kürzesten N-terminalen Sequenzen, welche für ein zielgerechtes Targeting ausreichend waren. Also die Konstrukte 1-44 ABCA3-YFP und 1-60 ABCA3-YFP.

24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf ihre Aktivität getestet, anschließend lysiert und eine Elektrophorese auf Polyacrylamidgel durchgeführt.

Nach der Auftrennung der Proteine wurde ein Western Blot mit einem primären Antikörper gegen YFP durchgeführt. Mithilfe eines an alkalische Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörpers konnten nun die Fusionsproteine dargestellt und von der Größe gegen einen Referenzmarker eingeordnet werden.

Hierbei konnte die erwartete molekulare Größe der Konstrukte bestätigt werden. Im Falle von 1-44 ABCA3-YFP zeigte sich eine Bande im Bereich von etwa 33 kDa. Dies entspricht der berechneten molekularen Maße von 32,8 kDa des Fusionsproteins, bestehend aus YFP (28 kDa) plus der ersten 44 Aminosäuren des ABCA3-Proteins (4,8 kDa). Im Fall des 1-60 ABCA3-YFP zeigt sich eine Markierung bei etwa 35 kDa, was ebenfalls der berechneten Maße von 34,6 kDa entspricht.



**Abbildung 4.9:** Western-Blot der Konstrukte 1-44 ABCA3-YFP (1,2) und 1-60 ABCA3-YFP (3), welche in A549 Zellen expremiert wurden. Die Immundetektion wurde mit einem Antikörper gegen YFP durchgeführt.

## 5. Diskussion

Mutationen im *ABCA3*-Gen gehören zu den jüngst bekannt gewordenen genetischen Ursachen von Atemwegserkrankungen im Neugeborenenalter. Über die molekularen Grundlagen der Erkrankung ist bisher sehr wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher das Targeting des *ABCA3*-Transporters zu untersuchen und gleichzeitig Hinweise auf Verteilungsstörungen zu erhalten. Die Hauptaufgabe des ABC-Proteins der Subgruppe A ist der Transport lipophiler Substanzen in den Alveolar Typ II Zellen der Lunge. Hierbei scheint der Transporter eine essentielle Funktion für den Surfactant-Stoffwechsel zu besitzen.

Das Atemnotsyndrom des Neugeborenen ist eine Erkrankung, welche mit einem Defekt von *ABCA3* verbunden sein kann (Shulenin S 2004). Bei den untersuchten und nach entsprechenden Kriterien ausgewählten Patientenkollektiven zeigte sich eine hohe Prozentzahl von Kindern mit Mutationen im *ABCA3*-Gen. Auf Proteinebene ist die Erkrankung nur unzureichend geklärt. Neben Defekten am Protein selber könnte auch ein fehlgeleitetes Targeting als Ursache dieses Krankheitsbildes denkbar sein.

Über die Targeting-Mechanismen der humanen ABC-Proteine ist bislang sehr wenig bekannt. Insbesondere die Targetingsignale der 4 bisher in ihrer Funktion bekannten ABC-Proteine der Subgruppe A sind unbekannt.

Ein hypothetischer Ansatz dieser Arbeit war, dass eine Mutation in der Targetingsequenz des *ABCA3*-Proteins zu Verteilungsstörungen innerhalb der Zelle und damit zu einer Erkrankung führen könnte.

Um dieser Fragestellung näher zu kommen war es zunächst notwendig den für das korrekte Targeting verantwortlichen Bereich des *ABCA3*-Proteins zu definieren.

Um die Signalpeptide des *ABCA3*-Proteins eingrenzen zu können, haben wir ein Fusionsprotein aus humanen *ABCA3* und einem C-Terminal angeschlossenen gelb fluoreszierenden Protein (YFP) entwickelt. Gemeinsam mit einem Fusionsprotein aus dem Surfactantprotein C und einem cyan fluoreszierenden Protein (CFP) führten wir daraufhin Kolokalisationsstudien in einem eukaryontischen Zellkultursystem durch und beobachteten die zelluläre (Sub-)Lokalisation mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie.

Die beiden vom grün fluoreszierenden Protein (GFP) abgeleiteten Proteine YFP und CFP sind ihrer nativen Form zytosolisch lokalisiert. Aufgrund von Transfektionsartefakten hätte es zu einer subzellulären Lokalisation der Proteine kommen können. Um diese Fehlerquelle auszuschließen führten wir eine Transfektion der A549-Zellen mit nativen YFP durch und konnten so die zytosolische Lokalisation bestätigen.

Durch die Fusion des Volllängenprodukts aus *ABCA3* mit YFP konnte eine Darstellung des *ABCA3*-Proteins im Lamellarkörperchen erfolgen. Durch die Kotretransfektion mit dem nachweislich in dieser subzellulären Struktur vorhandenen SPC, welches mit CFP fusioniert worden war, konnte die Lokalisation nachvollzogen werden.

Aufgrund von Ergebnissen aus Vorstudien, welche mit dem ABCD1-Protein (ALD) in unserer Arbeitsgruppe gemacht wurden, gingen wir bei ABCA3 zunächst von einer N-terminalen Targeting-Sequenz aus. Die Vermutung wurde von der Tatsache unterstützt, dass bei lysosomalen Transmembranproteinen häufig eine zytoplasmatische Signalsequenz vorhanden ist.

Um die Signalpeptide nun genauer eingrenzen zu können wurden Fragmente von diesem Teil des Proteins mit YFP verbunden, transfiziert und wiederum in Kotransfektion mit CFP-SPC auf ihre subzelluläre Lokalisation hin untersucht.

Das ABCA3-Protein wurde in dieser Weise entsprechend der Sekundärstruktur sukzessive bis auf einen Umfang von 44 Aminosäuren verkürzt. Die ersten 44 Aminosäuren waren hierbei für ein korrektes Targeting ausreichend und zeigten eine Lokalisation in den Lamellarkörperchen der AT II Zellen. Um weiter zu untersuchen ob der N-Terminus des Proteins für das Targeting notwendig ist, wurde nun ein ABC-Konstrukt welchem die aminoterminalen 22 Aminosäuren fehlten zur Expression gebracht. Auch hierbei fand ein Transport zum Lamellarkörperchen statt.

Durch Koloalisationsstudien konnte somit die Targetingsequenz auf einen Bereich zwischen den Aminosäuren 22 bis 44 eingegrenzt werden und der Transport zum Lamellarkörperchen dargestellt werden. Die Sequenz der Aminosäuren 22 bis 44 in diesem Bereich des ABCA3-Proteins lautet: VLVTVLELFLPLLFSGILIWLRL.

Der letztendliche Beweis für ein Targetingsignal in diesem Bereich steht jedoch noch aus. Hierfür wären weitere Konstrukte notwendig, die diesen Teil der Sequenz ausschliessen und welche gleichzeitig ein fehlendes Targeting zu den Lamellarkörperchen zeigen.

Stellt man trotzdem die Sequenz in den Zusammenhang mit Targetingsequenzen lysosomaler Transmembranproteine so könnte es sich bei fehlenden tyrosinhaltigen Aminosäuren in diesem Teil des Proteins um eine Dileucin-basierte Targetingsignal handeln. In Frage käme hierbei insbesondere ein Motiv im Sinne der Konsensus-Sequenz (DE) XXL (LI). Diese Art von Signalen spielt eine wichtige Rolle in der Sortierung von vielen Typ I und II Transmembranproteinen lysosomaler Strukturen. Die häufigste Lokalisation ist hierbei in den späten Endosom und in den Lysosomen (z.B. NPC1, LIMPII), in den endosomal-lysosomalen Kompartimenten und in Vesikeln zur Lagerung (GLUT4), sowie in Melanosomen und deren Vorstufen (TRP1). Bei den Melanosomen handelt es sich ebenfalls um lysosomal abgeleitete Zellorganellen.

Das von uns bei dieser Arbeit verwendete Zellkultursystem aus A549 und die Kotransfektion mit den beiden Fluoreszenzproteinen haben sich im Verlauf als gut und einfach zu verwendende Methode für die Darstellung von ABCA3 in der Zelle gezeigt.

Ein Problem der verwendeten Methode der Kotransfektion ist sicherlich, dass keine endgültige Aussage über die angefärbten Strukturen gemacht werden kann.

Denn trotz der Übereinstimmung der Fluoreszenzsignale ist eine Unterscheidung zwischen Lamellarkörperchen und Lysosomen in dieser Weise nicht zu treffen. Hierfür wäre eine direkte Darstellung, beispielsweise mit einem Elektronenmikroskop notwendig.

Durch die von uns bisher durchgeführten Versuche zum Targeting von ABCA3 konnte zwar der Bereich in welchem sich das Signalpeptid befindet eingegrenzt werden, das exakte Signal konnte jedoch nicht definiert werden. Neben dem erwähnten Gegenkonstrukt wären weitere Konstrukte mit einer signifikanten Mutationen in diesem Bereich vonnöten, welche ein klares Fehltargeting zeigen müssten.

Die steigende Zahl an Veröffentlichungen, welche sich mit der Thematik ABCA3-Mangel und Atemnotsyndrom des Neugeborenen beschäftigen zeigt die klinische Relevanz molekular-biologischer Grundlagenforschung. Fehlverteilungsstörungen des Proteins könnten hierbei einen wesentlichen Pathomechanismus darstellen. Inwieweit Mutationen in der Targetingsequenz des Proteins relevant für eine Erkrankung sind ist hierbei eine noch offene Frage.

Die vorliegende Untersuchung hat hierbei Hinweise auf eine amino-terminale Lokalisation der Signalpeptide gegeben. Die Frage nach der exakten Signalsequenz des ABCA3-Proteins muss in weiteren Studien geklärt werden.

## 6. Zusammenfassung

Mutationen im *ABCA3*-Gen gehören zu den jüngst bekannt gewordenen Ursachen eines Atemnotsyndroms bei reifen Neugeborenen. Der *ABCA3* Transporter gehört zu der großen Familie der ABC-Proteine. Die Funktion dieser Art von ATP-bindenden Proteinen ist der primär aktive Transport von verschiedenen Substraten über die Zellmembran unterschiedlicher Gewebe. Das Protein ist in der Außenmembran eines als Lamellarkörperchen bezeichneten Zellorganells in Typ II Alveolarzellen lokalisiert. Die genaue Funktion des *ABCA3*-Proteins ist unklar, wobei es eine Schlüsselrolle im Surfactant-Metabolismus zu besitzen scheint. Es wurden bisher bereits über 70 rezessive Mutationen im *ABCA3*-Gen beschrieben. Ein Teil dieser Mutationen führt zu akuten und chronischen Atemwegserkrankungen im Neugeborenen- und Kindesalter. Mutationen im Targetingsignal des Proteins wären hierbei ein denkbarer Pathomechanismus. Ziel dieser Arbeit war es daher Targetingsignale im *ABCA3*-Protein einzugrenzen und gegebenenfalls zu identifizieren um Hinweise auf mögliche Verteilungsstörungen zu erhalten. Für die Versuche wurde daher ein Zellkultursystem mit Typ II Alveolarzellen entwickelt in welchem unterschiedliche Konstrukte von Fusionsproteinen zur Expression gebracht wurden. Als Marker für ein korrektes Targeting zum Zielorganell wurde ein Fusionsprotein aus Surfactant Protein-C und dem cyan fluoreszierenden Protein CFP verwendet. Dieses wurde in Kolkalisationsstudien mit einem Fusionsprotein von *ABCA3* und dem gelb fluoreszierenden Protein YFP unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Fluoreszenzspektren beider Proteine waren hierbei deutlich getrennt. Zunächst wurde das gesamte *ABCA3*-Protein mit YFP transfiziert, wobei sich erwartungsgemäß eine Lokalisation im Lamellarkörperchen nachweisen ließ. Im Anschluss wurde eine sukzessive Verkürzung des Proteins durchgeführt. Hierbei gingen wir aufgrund von Erfahrungen mit anderen ABC-Proteinen von einer aminoterminalen Lokalisation der Signalsequenz aus. Die Versuche erbrachten das Ergebnis, dass eine Reduktion des *ABCA3*-Proteins auf einen Bereich in der Aminosäuresequenz von 1-44 und 22-115 noch ein funktionierendes Targeting zum Lamellarkörperchen zeigt. Hieraus ließe sich schließen, dass sich das Targetingsignal zwischen Aminosäure 22 und 44 befindet. Eine endgültige Aussage ob sich die Targetingsequenz in diesem Bereich mit der Sequenz VLVTVLELFLPLLFSGILIWLRL befindet lässt hierbei jedoch nicht machen. Hiefür wären weitergehende Untersuchungen notwendig, wobei Konstrukte mit fehlender oder in diesem Bereich mutierter Sequenz ein eindeutiges Fehltargeting zeigen müssten.

*ABCA3*-Mutationen könnten mit zu den bedeutenden Ursachen für genetisch bedingten Surfactant-Mangel gehören. Über die physiologische Bedeutung von *ABCA3* ist nur sehr wenig bekannt. Eine weitere Erforschung der normalen Funktion des Proteins wird hierbei in Zukunft wichtig sein für das Verständnis der Erkrankung und medizinische Pathomechanismen.

## 7. Anhang

### 7. 1 Literaturverzeichnis

Akiyama M, S.-N. Y., Sakai K, McMillan JR, Goto M, et al. (2005). "Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer." J Clin Invest **115**: 1777-1784.

Allikmets R, S. N., Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS et al. (1997). "Mutations of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration." Science **277**: 1805-1808.

Allikmets R, S. N., Sun H, et al. (1997). "A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy." Nat Genet. **15**: 236-246.

Annilo T, S. S., Chen ZQ, Arnould I, Prades C, Lemoine C, Maintoux-Larois C, Devaud C, Dean M, Deneffe P, Rosier M. (2002). "Identification and characterization of a novel ABCA subfamily member, ABCA12, located in the lamellar ichthyosis region of 2q34." Cytogenet. Genome Res. **98**: 169-176.

Bodzioch M, O. E., Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. (1999). "The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease." Nat Genet. **22**(4): 347-351.

Bonifacino J. S., T. L. M. (2003). "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." Annu. Rev. Biochem. **72**: 395-447.

Bullard JE, W. S., Noguee LM (2006). "ABCA3 Deficiency: Neonatal Respiratory Failure and Interstitial Lung Disease." Semin Perinatol **30**: 327-334.

Bullard JE, W. S., Whitsett JA, et al. (2005). "ABCA3 Mutations associated with pediatric interstitial lung disease." Am J Respir Crit Care Med **172**: 1026-1031.

Cheong N, M. M., Gonzales L, Zhao M, Yu K, Ballard P, Shuman H (2006). "Functional and Trafficking Defects in ATP Binding Cassette A3 Mutants Associated with Respiratory Distress Syndrome." Journal of Biological Chemistry **281**(14): 9791-9800.

Conkright JJ, B. J. e. a. (2001). "Secretion of surfactant protein C, an integral membrane protein, requires the N-terminal propeptide." J Biol Chem **276**: 14658-14664.

Couchard M, P. J., Bomsel F, (1974). "Maladie des membranes hyalines. Diagnostic et surveillance radiologiques. Traitement, complications. Etude radioclinique de 589 cas." Ann Radiol **17**: 669-683.

de Mello DE, H. S., Phelps DS, et al. (1994). "Ultrastructure of lung in in surfactant protein B deficiency." Am J Respir Cell Mol Biol **11**: 230-239.

- Dean M., A. T. (2005). "Evolution of the Atp-binding cassette (Abc) transporter superfamily in vertebrates." Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. **6**: 123-142.
- Dell'Angelica EC, M. C., Caplan S., Bonifacino JS (2000). " Lysosome-related organelles." FASEB J. **14**: 1265-1278.
- Fan LL, L. C. (1993). "Chronic interstitial lung disease in children." Pediatr Pulmonol **16**: 184-196.
- Fan LL, M. A., Brugman SM, et al. (1992). "Clinical spectrum of chronic interstitial lung disease in children." J Pediatr **121**: 867-872.
- Fitzgerald ML, X. R., Haley KJ, Welti R, Goss JL, Brown CE, Zhuang DZ, Bell SA, Lu N, McKee M, Seed B, Freeman MW. (2006). "ABCA3 inactivation in mice causes respiratory failure, loss of pulmonary surfactant and depletion of lung phosphatidylglycerol." J Lipid Res.
- Higgins (1992). " ABC transporters: from micro-organisms to man." Annu Rev Cell Biol(8): 67-113.
- Hyde SC, E. P., Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. (1990). " Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport." Nature **346**: 362-365.
- Kari MA, H. M., Eronen M, Teramo K, Virtanen M, Koivisto M, Ikonen RS (1994). "Prenatal dexamethasone treatment in conjunction with rescue therapy of human surfactant: a randomized placebo-controlled multicenter study." Pediatrics **93**(5): 730-6.
- Kelsell DP, N. E., Unsworth H, et al. (2005). "Mutations in ABCA12 underlie the severe congenital skin disease harlequin ichthyosis." Am J Human Genet **76**: 794-803.
- Koletzko (2004). Kinderheilkunde, Springer Verlag.
- Lefevre S, A. S., Jobard F, et al. (2003). "Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis typ 2." Hum. Mol. Genet. **12**: 2369-2378.
- Milligan DW, A. S. (2001). "Animal-derived or synthetic surfactant for the treatment of neonatal respiratory distress syndrome: a review." Acta Paediatr Suppl. **90**(436): 25-7.
- Mulugeta S., G. J. M., Notarfrancesco K. L., Gonzales L. W., Koval M., Feinstein S. I., Ballard P. L., Fisher A. B., Shuman H. (2002). "Identification of LBM180, a Lamellar Body Limiting Membrane Protein of Alveolar Typ II Cells, as the ABC Transporter Protein ABCA3." J. Biol. Chem. **277**: 22147-22155.
- N. Klugbauer, F. H. (1996). "Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localisation on the band encoding the multidrug resistance-associated protein." FEBS Lett.(391): 61-65.
- Nagata K, Y. A., Ban N, et al. (2004). "Human ABCA3, a product of a responsible gene for abca3 for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellar vesicles." Biochem Biophys Res Commun **324**: 262-268.



Nogee, L. (2004). "Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease." Annu Rev Physiol **66**: 601-623.

Nogee LM, d. M. D., Dehner LP, et al (1993). "Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein b in congenital alveolar proteinosis." N Engl J Med **328**: 406-410.

Phelps DS, F. J. (1991). "Localization of Pulmonary Surfactant Proteins Using Immunohistochemistry and Tissue Insitu Hybridisation." Experimental Lung Research **17**: 985-995.

Serfaty-Lacrosniere C, C. F., Lanzberg A, Isaia P, Berg J, and S. M. J. Janus ED, Pritchard PH, Frohlich J, Lees RS, et al. (1994). "Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease." Atherosclerosis **107**(1): 85-98.

Shulenin S, N. L., Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M. (2004). "ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency." N Engl J Med **350**(13): 1296-1303.

Tryka AF, W. S., Mazursky JE, et al (2000). "Absence of lamellar bodies with accumulation of dense bodies characterizes a novel form of congenital surfactant defect." Pediatr Dev Pathol **3**: 335-345.

Walker JE, S. M., Runswick MJ, Gay NJ. (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." EMBO J. **1**(8): 945-951.

Weaver, T. (1998). "Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C." Biochem Biophys Acta **1408**: 173-179.

Weaver TE, C. J. (2001). "Function of surfactant proteins B and C." Annu Rev Physiol **63**: 555-578.

Yamano G., F. H., Kawanami O., Zhao L.X., Ban N., Uchida Y., Morohoschi T., Ogawa J., Shioda S., Inagaki N. (2001). "ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells." FEBS Lett. **508**: 221-225.

Yoshida I, B. N., Inagaki N. (2004). "Expression of ABCA3, a causative gene for fatal surfactant deficiency, is up-regulated by glucocorticoids in lung alveolar type II cells." Biochem Biophys Res Commun **323**: 547-555.

## 7.2 Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1.1	Übersicht über Erkrankungen mit Mutation in <i>ABC</i> -Genen	6
Tabelle 1.2	Vergleich unterschiedlicher Surfactant-Mangelsyndrome	10
Tabelle 3.1	Primer für die Erstellung des Fusionsproteins SPC/pECFP-C1	16
Tabelle 3.2	Primer für die Erstellung des Fusionsproteins ABCA3/pEYFP-N1	16
Tabelle 3.3	Primer der verkürzten Produkte aus ABCA3	16
Tabelle 3.4	Verwendete Restriktionsenzyme	18
Tabelle 3.5	Größe und Herkunft der verwendeten Plasmide	20
Tabelle 3.6	Übersicht über Zellkulturmedien und deren Herkunft	28
Tabelle 3.7	Für die Transfektion genutzte Zelllinien	29
Tabelle 3.8	Primäre Antikörper	31
Tabelle 3.9	Sekundäre Antikörper	31
Tabelle 3.10	Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Fluoreszenzproteine	32
Tabelle 3.11	Antikörper für den Western Blot	34
Tabelle 4.1	Fusionskonstrukte und subzelluläre Lokalisation	41
Tabelle 4.2	Die ersten drei verkürzten Konstrukte und deren Kolokalisation	43
Tabelle 4.3	Weitere verkürzten Konstrukte und deren Kolokalisation	44

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

		<b>Seite</b>
Abbildung 1.1	Radiologisches und histologisches Bild bei Surfactant-Mangel	3
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung eines ABC-Transporters	4
Abbildung 1.3	Schematische Darstellung eines ABCA3-Proteins	8
Abbildung 1.4	Elektronenmikroskopisches Bild bei Surfactant-Mangelsyndromen	11
Abbildung 3.1	Vektorkarte von pEYFP-N1	27
Abbildung 3.2	Multiple Klonierungsstelle des Vektors pEYFP-N1	27
Abbildung 3.3	Multiple Klonierungsstelle des Vektors pECFP-C1	28
Abbildung 4.1	Übersicht über die Expressionskonstrukte	37
Abbildung 4.2	Emissions- und Exzitationsspektren der Fluoreszenz-Proteine	38
Abbildung 4.3	Graphik zur Wahrscheinlichkeit von Transmembrandomänen	39
Abbildung 4.4	Aminosäuresequenzen verschiedener ABC-Proteine im Vergleich	40
Abbildung 4.5	Kolokalisationsstudie mit ABCA3, SP-C und SP-B	42
Abbildung 4.6	Kolokalisation der ersten drei Fusionskonstrukte	43
Abbildung 4.7	Kolokalisation weiterer Konstrukte	45
Abbildung 4.8	Kolokalisaton des Konstruktes mit fehlenden Aminoterminus	46
Abbildung 4.9	Darstellung zweier Konstrukte im Western-Blot	47

## 7.4 Danksagung

Herrn Prof. Dr. D. Reinhardt möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit in den Laboratorien der AG Molekulare Biologie am Forschungszentrum Kubus des von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. A. Holzinger für die Überlassung des Themas, die Betreuung und Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Markus Hammel für die unermüdliche Betreuung und das brüderliche Teilen des Arbeitsplatzes während der Arbeit bedanken.

Bei meinem guten Freund und lebenden biochemischen Lexikon Andi März möchte ich mich für die Hilfe bei der Lösung diverser praktischer und theoretischer Probleme bedanken. Ohne seinen Support und seine Geduld im Umgang mit der chirurgischen Vorstellung von Molekularbiologie des Autors wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Unsagbarer Dank gilt allen Mitgliedern meiner Familie. Insbesondere jedoch meinen lieben Eltern, die mir mit ihrer liebevollen Selbstlosigkeit immer ein Vorbild sein werden.

Sarah Buschor möchte ich für die umfassende Unterstützung während der Arbeit und ihre engelhafte Geduld mit mir danken.

## 7.5 Lebenslauf

**Geburtsdatum**                      **07.05.1978 in Bonn**

### *Schulische Bildung*

1984 - 1988	Grundschule Wiedenhof, Waldbröl
1988 - 1991	Hollenberg-Gymnasium, Waldbröl
1991 - 1995	Humboldt-Gymnasium, Köln
1995 - 1998	Europaschule, Köln
1998	Abitur

### *Zivildienst*

1998 - 1999	Evangelisches Krankenhaus, Köln Allgemeinchirurgie
-------------	---

### *Studium*

1999 - 2003	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
April 2002	Ärztliche Vorprüfung
April 2003	Erstes Staatsexamen
2003 - 2006	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
April 2005	Zweites Staatsexamen
2005-2006	Praktisches Jahr: 1. Terial an der Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie Krankenhaus Dritter Orden, München 2. Terial an der Klinik für Innere Medizin des Kantonsspitals Winterthur CH 3. Terial des Praktischen Jahres an der Klinik für Kinderchirurgie des Dr. Von Haunerschen Kinderspitals München
Mai 2006	Drittes Staatsexamen

### *Berufliche Tätigkeit*

Juni 2006 – Juni 2007	Assistenzarzt an der Klinik für Kinderchirurgie des Inselspitals Bern CH
Seit Juli 2007	Assistenzarzt an der Klinik für Kinderchirurgie des Kinderspitals Zürich CH